Rafael de Cássio Bernardi

ANESTÉSICOS E A REGULAÇÃO DE CANAIS IÔNICOS K_{2P}

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Clências da Saúde Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Rafael de Cássio Bernardi

ANESTÉSICOS E A REGULAÇÃO DE CANAIS IÔNICOS K_{2P}

Tese apresentada ao programa de pósgraduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Dr. Pedro Geraldo Pascutti. Co-orientador: Dr. Werner Treptow

Rio de Janeiro 2010 Bernardi, Rafael de Cássio

Anestésicos e a regulação de canais iônicos K_{2P} / Rafael de Cássio Bernardi. - Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti

Co-orientador: Prof. Dr. Werner Treptow

1. Anestésicos. 2. Membrana. 3. Canais lônicos. 4. TREK-1. 5. Dinâmica Molecular. -- Tese. I. Pascutti, Pedro Geraldo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

"ANESTÉSICOS E A REGULAÇÃO DE CANAIS IÔNICOS K2P"

RAFAEL DE CÁSSIO BERNARDI

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 26 DE AGOSTO DE 2010.

de

PROF[®]. NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR - UFRJ)- COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

PROF. PEDRO GERALDO PAŚCUTTI (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADOR

Inna C reptow

PROF. WERNER TREPTOW (DOUTOR -- UFPE) -- CO-ORIENTADOR

PROF. PAULO MASCARELLO BISCH (DOUTOR - UFRJ) - REVISOR

PROF / GILBERTO WEISSMÜLLER (DOUTOR - UFRJ)

auce

PROFª. MARIA LÚCIA BIANCONI (DOUTOR - UFRJ)

PROF. ROBERTO DIAS LINS NETO (DOUTOR - UFRJ)

A todos que colaboraram com este trabalho

Google It! ou Read the F* Manual!

Frases muito ouvidas pelos colegas de laboratório durante estes anos.

AGRADECIMENTOS

A Juliana, minha paixão, pela força carinho e compreensão em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti, que me orientou neste trabalho, apoiando sempre e se mostrando um ótimo orientador e amigo;

Ao Prof. Dr. Werner Treptow, co-orientador nos trabalhos com o canal e sempre disposto a ajudar;

Ao Prof. Dr. Carlton Anthony Taft, co-orientador e grande incentivador;

Ao Prof. Dr. André Tsutomu Ota, primeiro orientador e amigo em todas as árduas etapas, desde os primeiros passos na ciência;

Ao Prof. Dr. Michael L. Klein, que me recebeu em seu laboratório durante o doutorado sanduíche;

Aos meus pais, pela força e confiança, mesmo nos momentos mais difíceis;

A minha irmã, que sempre me deu muita força, e ao contrario de muitos sempre confiou muito em minha capacidade;

Aos meus amigos e colegas, pela união em todos os momentos, desde os primeiros passos até aqui;

Ao Diego e Tácio do LMDM que colaboraram muito pela conclusão dos cálculos realizados neste trabalho, especialmente ajudando na montagem do cluster;

Ao Pedro Loureiro do LMDM que sempre estava disposto a ajudar, dar dicas e a mostrar que algo podia ser feito de uma forma diferente.

A todos os colegas do LMDM, pelo apoio e em especial pelas risadas nos momentos engraçados onde alguma coisa foi desligada sem querer, ou alguma idéia "genial" surgia.

A todos os meus professores, desde a pré-escola até hoje, que sempre me ensinaram a buscar, cada vez mais, tentar entender os fenômenos a nossa volta;

Ao CNPq que me concedeu uma bolsa de doutorado e a FAPERJ/INMETRO que me concedeu uma bolsa para continuar desenvolmendo meus trabalhos;

A UFRJ e a UPenn que me acolheram e deram condições para a realização deste trabalho.

A todos da UEL e do CBPF por ajudarem a chegar até aqui;

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho;

Especialmente gostaria de agradecer aos membros da banca que estão corrigindo e sugerindo avanços neste trabalho;

A todos vocês: Muito Obrigado!

BERNARDI, Rafael C., *Anestésicos e a Regulação de Canais lônicos K*_{2P}, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biofísica), IBCCF – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RESUMO

Detalhar o mecanismo de ação dos anestésicos, tanto locais (LA) como gerais (GA), tem sido a proposta de diversos estudos, uma vez que este ainda não é bem estabelecido. A interação destes fármacos com os canais iônicos e com os lipídios das membranas parece ser fundamental para compreender este efeito. Experimentos têm mostrado que o TREK-1, um canal K_{2P}, é muito importante para o efeito anestésico. A maior parte da sensitividade deste canal é atribuída a sua região C-terminal, que trabalha como um domínio sensor para integrar a ação do anestésico à atividade do canal. Nosso trabalho visa investigar por dinâmica molecular o efeito anestésico, em especial a interação destas moléculas com o canal TREK-1 e com membranas biológicas. Nossos resultados revelam a existência de um acoplamento direto entre a região C-terminal do canal e a superfície da membrana. Observamos que lipídios negativamente carregados e o meio intracelular ácido podem também aumentar esta interação. Nossas simulações com o anestésico geral isoflurano mostram que a abertura do canal deve ser uma reação indireta do mesmo ao inchaço da membrana. Com relação aos anestésicos locais, nossas simulações de dinâmica molecular combinadas com cálculos de perfil de energia livre e com cálculos QM/MM, indicam que a forma carregada dos LAs permanece na inteface entre água e lipídio, enguanto a forma neutra pode cruzar a membrana.

Palavras-chave: Anestésicos, membrana, canais iônicos, TREK-1, dinâmica molecular.

BERNARDI, Rafael C., *Anesthetics and the K2P Channel Regulation* 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biofísica), IBCCF – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ABSTRACT

Detailing the action mechanisms of anesthetics, both local (LA) and general (GA), have been the purpose of several studies, since this is not well established. The anesthetics interactions with ion channels and membrane lipids are essential to understand its effect. Experiments had showed that the TREK-1, a K_{2P} channel, is of paramount importance for these anesthetic effects. Most of the channel sensitivity to local and GA is attributed to its intracellular C-terminal moiety, which works as a sensor domain required for integration of the anesthetic action into channel activity. We have investigated by MD simulations the anesthetic effect, specifically its interaction with the biological membrane and the TREK-1 channel. Overall, the MD study reveals a direct coupling of the TREK-1 C-terminus to the intracellular membrane surface. Also, negatively charged lipids and intracellular acidosis could increase such interaction. In our simulations with the general anesthetic isoflurane, we show that the channels opening must be an indirect reaction of the membrane swelling. Regarding the local anesthetics, our MD simulations combined with free-energy and QM/MM calculations, indicate that charged forms of LA interacts most with the lipid/water interface and that uncharged LA can interchange between both bilayer faces.

Key-words: Anesthetics, membrane, ionic channel, TREK-1, molecular dynamics.

Sumário:

1-Introdução:	1
1.1 – Fluxo através da membrana celular:	5
1.2 – Seletividade na permeação da membrana:	7
1.3 – Canais iônicos:	8
1.4 – Canais de potássio K _{2P} .	12
1.5 – O efeito anestésico:	15
1.6 – Anestesia Geral:	16
1.7 – Anestesia Local:	17
1.8 – Técnicas Computacionais:	22
2 – Objetivos:	27
2.1 – Objetivos específicos:	27
3 – Metodologia:	29
3.1 – Modelagem Molecular Clássica:	29
3.2 – Métodos quânticos no tratamento de átomos e moléculas:	59
3.2.1 – Métodos Semi-Empíricos:	60
3.2.2 – Método do funcional da densidade:	64
3.2.3 – Car-Parrinello Molecular Dynamics (CPMD):	74
3.2.4 – Métodos Híbridos de Dinâmica Molecular (QM/MM):	75
3.3 – Protocolos e parâmetros para os cálculos de dinâmica molecular:	76
Rafael C. Bernardi	x

4 – Resultados e Discussões:	77
4.1 – Parametrização dos campos de forças e estudos com Anestésicos	Locais em
solvente aquoso:	77
4.2 – Interação entre Anestésicos Locais e membranas biológicas:	89
4.3 – Permeabilidade em membrana:	99
4.4 – Estabilidade da Benzocaína por QM/MM.	105
4.5 – Canal TREK-1:	109
4.6 – TREK-1 em membranas mistas de POPC/POPS:	135
4.7 – O canal TREK-1 e o efeito anestésico local:	139
5 – Conclusão:	142
6 – Perspectivas:	145
7 – Anexos:	146
8 – Referências Bibliográficas:	148

ANEXOS:

R	afael C. Bernardi	xi	
	Anexo 7.6 – Artigo em fase final de preparo (Hoelz et al.):		202
	Anexo 7.5 – Artigo para ser publicado (Gobato et al. 2010):		191
	Anexo 7.4 – Artigo Publicado (Bernardi et al. 2009):		184
	Anexo 7.3 – Artigo Publicado (Bernardi et al. 2007):		177
	Anexo 7.2 – Artigo Publicado (Bernardi et al. 2007):		169
	Anexo 7.1 – Artigo Publicado (Bernardi et al. 2006):		163

Anexo 7.7 – Artigo em fase final de preparo (Bernardi et al.):	218
Anexo 7.8 – Resumo de artigo em fase de preparo (Mendes et al.):	230
Anexo 7.9– Resumo de trabalho em andamento:	233
Anexo 7.10 – Resumo de trabalho em andamento:	235
Anexo 7.11 – Projeto de trabalho em andamento – Pós-Doutorado:	240
Anexo 7.12 – O cluster Jaguatirica:	243
Anexo 7.13 – Arquivo de parâmetros (GROMACS e NAMD):	245

Lista de llustrações:

Figura 1: Molécula de DPPC.	3
Figura 2: Bicamada lipídica de DPPC solvatada.	4
Figura 3: Esquema representando o canal iônico, com destaque para o filtro de seletividade.	10
Figura 4: Diversidade e propriedades estruturais dos canais K _{2P} humanos.	13
Figura 5: Fórmula geral dos anestésicos locais.	20
Figura 6: Deslocalização da nuvem eletrônica nos anestésicos locais.	20
Figura 7: Ligação da molécula da tetracaína protonada ao receptor.	21
Figura 8: Propagação do impulso nervoso.	21
Figura 9: Mecanismo de ação dos anestésicos locais no nível molecular.	26
Figura 10: Sistema de orientação usado na modelagem molecular.	30
Figura 11: Representação da ligação direta entre um átomo e outro.	34
Figura 12: Representação do ângulo entre as ligações de três átomos.	34
Figura 13: Representação do ângulo formado entre dois planos formados por quarto átomos da molécula.	35
Figura 14: Representação do ângulo de torsão em torno de uma ligação química.	36
Figura 15: Representação do termo de potencial de van der Waals.	37
Figura 16: Representação do termo de potencial de Coulomb.	38
Figura 17: Representação em duas dimensões do modelo de condição periódica de contorno.	48
Figura 18: Modelo da interface utilizando método das imagens.	50
Figura 19: Representação da membrana celular.	52
Figura 20: Fórmula química dos anestésicos locais: Tetracaína (TTC), Procaína (PRC) e Lidocaína (LDC).	78
Figura 21: Captura da tela do software Ghemical.	82
Figura 22: Ilustação do anestésico local benzocaína em uma caixa d'água.	85
Figura 23: Gráfico da RDF do hidrogênio que protona os LA em relação aos oxigênios da água.	86
Figura 24: Gráfico da RDF do oxigênio da carbonia em relação aos hidrogênios das moléculas d'água.	87
Figura 25: Captura de imagem da dinâmica molecular da LDC protonada na membrana de DPPC.	90

Figura 26: Procaína mostrando a distância entre o nitrogênio do terminal amina e o oxigênio da carbonila.	91
Figura 27: Anestésicos locais utilizados nos cálculos de interação com a membrana de DPPC.	91
Figura 28: Posição dos Anestésicos Locais após a MD de 50 ns.	93
Figura 29: Bicamada Lipídica com indicação do eixo z.	94
Figura 30: Gráfico representando a posição dos átomos de referência dos LA.	95
Figura 31: Gráfico representando a posição dos átomos de referência da tetracaína.	96
Figura 32: Análise da função de distribuição radial dos átomos de fósforo ao redor do terminal amina.	98
Figura 33: Perfil de energia livre para uma molécula de etanol em diferentes concentrações.	102
Figura 34: Perfil de energia livre de partição na membrana da molécula de benzocaína.	103
Figura 35: Ilustração do perfil de energia livre do etanol.	105
Figura 36: Ilustração da membrana de DPPC com o anestésico local BZC.	106
Figura 37: Ilustração das três moléculas simuladas com o método quântico CPMD.	107
Figura 38: Função de distribuição radial dos átomos de oxigênio do grupamento palmitoil da DPPC.	108
Figura 39: Ilustração da topologia dos canais K _{2P} .	110
Figura 40: Alinhamento das sequências do TREK-1 e dos moldes utilizados.	112
Figura 41: Estrutura inicial do TREK-1 em um patch de SOPC.	113
Figura 42: Ilustração do acoplamento da região C-terminal com a membrana lipídica.	114
Figura 43: TREK-1 simetrizado na membrana de POPC.	115
Figura 44: Sistema com o TREK-1 truncado na região C-terminal.	116
Figura 45: Ilustração da estrutura secundária da região C-terminal do TREK-1.	116
Figura 46: Ilustração do sistema simulado.	117
Figura 47: Esquema com as simulações realizadas.	118
Figura 48: Análise da estrutura secundária de um dos monômeros do canal TREK-1.	119
Figura 49: Ilustração do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios da membrana.	119
Figura 50: Ilustração do movimento do domínio C-terminal do TREK-1.	120
Figura 51: Gráfico do ângulo de inclinação da $lpha$ -hélice da região C-terminal.	120
Figura 52: Superfície eletrostática do TREK-1 na sua conformação após a dinâmica molecular.	121
Figura 53: Ilustração do método de estiramento da membrana.	122

Rafael C. Bernardi

xiv

Figura 54: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios de POPC da membrana.	123
Figura 55: Ilustração do acoplamento do C-terminal do TREK-1 com a membrana de POPC.	125
Figura 56: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios de POPC da membrana.	126
Figura 57: Ilustração da aplicação do método de SMD.	127
Figura 58: Ilustração dos rafts de lipídio.	128
Figura 59: Vista do poro do canal sob a influência de diferentes estímulos.	129
Figura 60: Ilustração do sistema com o anestésico geral Isoflurano na água.	130
Figura 61: Canal TREK-1 com destaque para a região do filtro de seletividadee para o gate de leucinas.	131
Figura 62: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios de POPC da membrana.	132
Figura 63: Ilustração da análise de PCA, indicando o movimento na região TM do canal TREK-1.	134
Figura 64: Ilustração da abertura do canal por dois pontos de vista.	135
Figura 65: Vista da bicamada mostrando a superfície com diferentes lipídios.	136
Figura 66: Ilustração mostrando o acoplamento entre o domínio C-terminal do TREK-1 e os lipídios POPS.	137
Figura 67: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios da membrana.	138
Figura 68: Ilustração do movimento oscilatório da membrana.	139
Figura 69: Ilustração do modelo de membrana de POPC curvada com e com o canal TREK-1.	139
Figura 70: Ilustação do sistema com o anestésico local Benzocaína e o canal TREK-1.	140
Figura 71: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios da membrana.	141

Lista de Abreviações e Siglas:

ABF.....Adapdative Biasing Force; AM1Austin Model 1; B3LYP.....Funcional Becke-style3, com correlação de Lee-Yang-Parr; BZCBenzocaína CI Interação da configuração; CNDO Complet Neglect of Differential Overlap; CPMD Car-Parrinello Molecular Dynamics; DFT.....Density Functional Theory – Teoria do Funcional da Densidade; DPPC.....Dipalmitoyl-phosphatidylcholine; EPRRessonância Paramagnética Eletrônica; ERIs Integrais de repulsão eletrônica; GA General Anesthetics – Anestésicos Gerais; GROMACS Groningen Machine for Chemical Simulations; HMOHückel Molecular Orbital; INDO.....Intermediate Neglect of Differential Overlap; LALocal Anesthetics – Anestésicos Locais; LDA.....Local Density Aproximation; LDCLidocaína; LMDM Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular; LSDALocal Spin Density Aproximation; MD Molecular Dynamics – Dinâmica Molecular; MM......Molecular Mechanics – Método clássico de mecânica molecular; MO......Molecular Orbitals – Orbitais moleculares: NDDONeglect of Dlatomic Differential Overlap; NPT Ensemble com número de átomos, pressão e temperatura constantes. NVT Ensemble com número de átomos, volume e temperatura constantes. PM3 Parameterized Model 3; PMF Potential of Mean Force – Potencial de Força Média; POPC.....Palmitoil-Fosfatidilcolina: POPS......1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine;

- PPPMétodo de Pariser-Parr-Pople;
- PRC Procaína;
- PW.....Perdew-Wang;
- QM.....Quantum Mechanics;
- RDFRadial Distribution Function Função de Distribuição Radial;
- RM1 Recife Model 1;
- SCF Self Consistense Field Método de Hartree-Fock;
- SOPC.....1-stearoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine;
- SMD.....Steered Molecular Dynamics;
- SPC Modelo de água;
- TM Transmembranar;
- TREK TWIK-Related K+ channel
- TTC..... Tetracaína;
- TWIK...... Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying K+
- VMD.....Software de visualização;
- UHF Unrestricted Hartree-Fock;

1-INTRODUÇÃO:

O transporte de íons, pequenas moléculas e até mesmo água através da membrana celular é de grande importância para a manutenção da vida. A regulação da passagem destas substâncias e de íons através da membrana é feita primeiramente pela própria capacidade seletiva da membrana que permite a separação de moléculas devido às suas diferentes características físico-químicas, como a hidrofobicidade. Entretanto, a grande maioria das substâncias que cruzam a membrana celular, o fazem via alguma proteína transportadora. Este tipo de proteína é geralmente muito especializada e transporta apenas um ou poucos tipos de elementos ou moléculas. Como estes canais trabalham em condições muito específicas e são afetados por diferentes condições externas a eles, estes passam a ser importantes para a transmissão de sinais através das células (Voet, et al., 2002).

Este fluxo de substâncias do meio extracelular para o meio intracelular, ou vice-versa, pode ocorrer a favor ou contra a direção dos gradientes de concentração ou químico. Se a troca de substâncias ocorre na direção do gradiente, ou seja, na direção de um menor potencial, a troca é energeticamente favorável e não há necessidade de adição de energia (como numa diálise), mas se o transporte é contra este gradiente, existe então a necessidade de adição de energia metabólica. Outro fator a ser considerado é se a substância a ser transportada tem uma carga líquida. Quando isto ocorre esta se moverá não apenas no gradiente de concentração, mas também através de um gradiente eletroquímico devido ao potencial da membrana.

Outra forma possível de transporte através da bicamada lipídica é o transporte por difusão passiva. Neste tipo de transporte o grande fator protetor da membrana para a célula, a sua natureza anfifílica, faz com que o transporte de certas substâncias seja possível. As

moléculas atravessam a membrana sem o auxílio de energia metabólica e sem a ajuda de proteínas transportadora. Porém poucas moléculas são capazes de difundir através da membrana lipídica, sendo que a maioria dos transportes através da bicamada envolvem uma proteína (Simonsen, et al., 2001).

Estas proteínas transmembranares (TM) geralmente possuem um grande conteúdo de alfa hélices na região da membrana, porém existem também proteínas de canal que formam barris de folhas beta e que são muito comuns em bactérias. As proteínas formadoras de canal trabalham de diversas formas e podem agir como bombas que são ativadas por ATP, a energia metabólica, ou apenas como um canal que facilita a difusão de um meio para outro.

Todos estes mecanismos são necessários devido à composição dos fosfolipídios, que apresentam uma característica anfipática, ou seja, sua cauda é bastante hidrofóbica e devido a sua polaridade a região da cabeça é hidrofílica. Como exemplo tomemos a DPPC (dipalmitoyl-phosphatidylcholine), um fosfolipídio bastante comum, a sua região do grupamento fosforil, representado na Figura 1 por uma esfera vermelha, apresenta uma carga residual negativa, enquanto o grupamento amina, esfera azul, possui carga residual positiva, gerando então um dipolo nesta região.

Em sistemas biológicos, estas características levam os fosfolipídios a formar a base das membranas celulares. Estas moléculas servem como uma matriz para os demais componentes da membrana, como proteínas, colesterol entre outras moléculas. O arranjo dos lipídios na membrana, na forma de bicamadas, proporciona a esta características que são muito importantes para a manutenção da vida, em especialmente na proteção do meio intracelular.

Rafael C. Bernardi

2



Figura 1: Molécula de DPPC. 1a: destaque para a região do dipolo formado pelo grupamento fosforil (vermelho) e o grupamento amina (azul). 1b: estrutura tridimensional do lipídio.

Como comentado, as membranas biológicas formam uma enorme barreira de proteção para a célula, uma vez que elas, junto com as suas componentes protéicas, trabalham de forma a selecionar as moléculas que entram e saem do meio intracelular. Outra característica importante para os seres vivos está na capacidade das membranas interagirem com fármacos e outras moléculas.

Na Figura 2 podemos ver a representação de uma membrana de DPPC junto com as duas camadas de solvente que representam o meio extra e intracelular. Uma característica importante deste arranjo é que por reduzir o número de graus de liberdade de outras substâncias que interagem com ela, a membrana pode ser considerada um ótimo catalisador, tanto para processos biológicos como em reações de interesse para processos nanotecnológicos.



Figura 2: Bicamada lipídica de DPPC solvatada. 2a: destaque para um lipídio de DPPC no meio da membrana mostrando sua posição. 2b: patch de 128 lipídios de DPPC.

Fármacos ou outras moléculas que possuam uma característica anfifílica, assim como anestésicos locais, interagem com a região logo abaixo da cabeça polar da membrana, alterando propriedades da mesma que são importantes, por exemplo, para a transmissão de sinais, transporte iônico, entre outras, mesmo não havendo difusão destas através da membrana (Dickey, et al., {2005}) (Pedersen, et al., 2007) (Aagaard, et al., 2006). Este tipo de comportamento é bastante importante para diversos processos celulares, assim como o processo de difusão.

1.1 – FLUXO ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR:

Como citado, existem três formas principais de fluxo de substâncias através da membrana celular:

Difusão Passiva:

A difusão acontece espontaneamente, aumenta a entropia do sistema e reduz a energia livre, não havendo proteína de membrana envolvida. O processo de transporte é influenciado pelas características da substância a ser transportada e pela natureza da bicamada. A velocidade da difusão em uma membrana pura de fosfolipídios dependerá então do gradiente de concentração, da hidrofobicidade, do tamanho e da carga líquida da molécula a ser transportada.

Algumas moléculas atuam como um facilitador deste tipo de difusão. Um exemplo é o etanol, que altera propriedades da membrana deixando-a mais permeável a moléculas anfifílicas. O mecanismo exato de atuação do etanol também é desconhecido, mas sabe-se que qualquer pequena molécula anfifílica, como alcoóis e anestésicos locais carregados, é capaz de se intercalar entre os lipídios da membrana alterando a fluidez e a permeabilidade destas bicamadas (Pedersen, et al., 2007). O etanol é um excelente exemplo, pois é muito pequeno e possui grande facilidade em auxiliar na sua própria partição na membrana bem como na partição de fármacos anfifílicos.

Difusão facilitada:

Este tipo de difusão ocorre de acordo com o mesmo principio termodinâmico do transporte passivo, ao longo do gradiente de concentração. Entretanto, aqui o fluxo é facilitado pela presença de canais protéicos, que facilitam o transporte de água e íons

através da membrana. Estas proteínas de membrana apresentam poros inseridos na bicamada com um interior hidrofílico que permite a passagem de substâncias que são extremamente lipofóbicas como os íons. Estes canais podem ser de dois tipos básicos, um em que a abertura é contínua e não é modulada por nenhum estímulo e outro em que existe a modulação para abertura e fechamento do canal (*gating*). Este segundo seria o responsável por diversos efeitos como a condução de sinal através de um neurônio (Voet, et al., 2002).

Transporte ativo:

Neste tipo de transporte o soluto é movido contra o gradiente de concentração ou o gradiente eletroquímico e para isto são necessárias proteínas de transporte que utilizam energia metabólica, geralmente ATP. Um fato importante a respeito deste tipo de proteína de transporte é que elas são extremamente seletivas e por esta razão também são alvos fáceis para uma inibição farmacológica seletiva. Um exemplo deste tipo de transporte são as bombas de sódio-potássio (Gadsby, 2009).

Algumas conseqüências fisiológicas deste tipo de transporte são muito conhecidas, como o fato de haver uma alta concentração de potássio no interior da célula e uma baixa concentração de sódio. O mecanismo responsável por este fenômeno é a bomba de sódio-potássio, que move estes dois íons em direções opostas através da membrana. Esta bomba é uma ATP-ase que retira três íons sódio da célula para cada dois potássios que bombeia para dentro da mesma (Gadsby, 2009). Esta proteína foi descoberta nos anos 50 pelo dinamarquês Jens Christian Skou, que por este trabalho recebeu o Nobel de química em 1997.

1.2 – SELETIVIDADE NA PERMEAÇÃO DA MEMBRANA:

Uma das principais características do transporte através de membranas biológicas é sua capacidade de selecionar e com isto barrar certos tipos de substâncias que tentam entrar na célula. Como isto ocorre já foi fonte de diversos estudos, porém diversas questões continuam abertas, em especial sobre o mecanismo de seletividade em escala molecular. Nos estudos até então realizados a permeabilidade da membrana tem sido em geral classificada de duas formas, a seletividade a eletrólitos e não-eletrólitos.

Não-eletrólitos:

A difusão deste tipo de substância é de extrema importância para diversos processos biológicos, em especial para a interação de fármacos com macromoléculas no interior da célula. Como exemplo, para que uma molécula possa interagir com as cadeias de DNA no interior do núcleo das células ela tem que ser capaz de atravessar pelo menos duas membranas lipídicas.

Substâncias que são hidrofóbicas normalmente passam através da membrana por dissolução na bicamada lipídica, ou seja, por difusão passiva. Porém diversas substâncias têm seu transporte através da membrana mediado por uma proteína transportadora, que pode ou não ser específica.

Eletrólitos:

Os canais iônicos são proteínas de membrana que possuem um poro interno que permite a passagem de pequenos íons. Esta região interna do canal possui diversas características, que serão discutidas mais a frente, para que os íons possam ser transportados. Quanto à seletividade destes canais, podemos pensar que como o tamanho

de um íon está relacionado à sua espécie química, a princípio um canal que permite a passagem de um íon de um determinado tamanho seria capaz de conduzir um íon de menor tamanho. Entretanto isto não acontece devido à seletividade destes canais, que é devida a dois fatores principais: a facilidade para desidratar um íon e a interação deste íon com as cargas internas do poro (Gadsby, 2009).

Para que um íon passe através do poro este precisa se dissociar das moléculas de água que o solvatam. Como a facilidade com que um íon perde suas camadas de solvatação está relacionada com o seu tamanho e sua carga, íons maiores perdem esta camada com maior facilidade do que íons menores e podem ser selecionados desta forma (Voet, et al., 2002). Também quando o interior do canal é composto por grupos polares, a interação destes resíduos com o íon pode ser mais importante do que a própria desidratação, conferindo assim uma outra forma de especificidade do canal. Por exemplo, um canal composto por histidinas e argininas, aminoácidos positivos, irão repelir íons com a mesma polaridade, mas vão facilitar a aproximação de íons negativamente carregados.

1.3 - CANAIS IÔNICOS:

Canais iônicos são proteínas encontradas em todas as células e que formam poros na membrana celular, permitindo o fluxo de íons a favor de seu gradiente eletroquímico, o que ajuda na estabilidade e no controle do gradiente de potencial da membrana plasmática (Voet, et al., 2002). As propriedades fundamentais da corrente em membranas, mediadas por canais iônicos foram analisadas primeiramente por Alan Hodgkin e Andrew Huxley como parte de sua pesquisa sobre potencial de ação, publicada em 1952 e que lhes redeu o Nobel de Fisiologia e Medicina de 1963. A comprovação da existência de canais iônicos somente

foi feita na década de 70 por Bernard Katz e Ricardo Miledi, porém uma demonstração mais direta destes foi feita apenas com a invenção da técnica de *patch-clamp*.

Estes estudos mostram o papel fundamental das proteínas de canal na regulação do fluxo de íons através da membrana das células, atestando sua importância para diversos processos fisiológicos. Quanto à estrutura tridimensional, estas proteínas são geralmente formadas por mais de uma subunidade em um arranjo circular em torno de um poro que forma um filamento de água. As subunidades que formam o poro são chamadas subunidades α , enquanto que as subunidades auxiliares são chamadas β , γ e assim por diante (Gadsby, 2009).

Alguns canais permitem a passagem de íons baseados somente na sua carga positiva ou negativa. Entretanto o mais comum é que apenas um ou dois tipos de átomo passem pela parte mais estreita do canal, o filtro de seletividade. A existência deste mecanismo de seletividade foi primeiramente postulado nos anos 60 por Clay Armstrong. Ele propôs que o filtro de seletividade poderia eficientemente substituir as moléculas de água que blindam os íons de potássio, mas os íons de sódio eram pequenos demais para permitir esta blindagem e por este motivo não poderiam passar. Então, como a região do poro emula um ambiente aquoso, os íons se movem através do canal passando um por vez na mesma velocidade que um íon se move na água (Voet, et al., 2002).

Este mecanismo de seletividade só foi confirmado com a elucidação da estrutura de um canal iônico, realizada recentemente (Doyle, et al., 1998). Além da região do filtro de seletividade a maioria dos canais iônicos apresenta uma região de *gate*, que pode abrir e fechar respondendo a estímulos diversos, dependendo de cada canal (Jiang, et al., 2002). Estudos mostram que a estrutura do canal é diferente para cada tipo de íon que este permite a passagem, depende também do tipo de regulação do *gate* e do o número de subunidades, Rafael C. Bernardi 9 além de outros aspectos. A classe de canal mais comum inclui os canais dependentes de voltagem que são os principais responsáveis pelo impulso nervoso e são constituídos por quatro subunidades com seis hélices transmembranares cada. Na ativação, estas hélices se movem de forma a abrir o *gate*. Duas das seis hélices são separadas por um loop que as mantém alinhadas formando o filtro de seletividade (Figura 3).



Figura 3: Esquema representando o canal iônico, com destaque para o filtro de seletividade.

Devido ao seu tamanho e a dificuldade de cristalizar proteínas integrais de membrana para a análise por raios-X, apenas recentemente foram realizadas as primeiras medidas diretas da estrutura do canal, publicadas em 1998 (Doyle, et al., 1998) (Jiang, et al., 2002) (Aqvist, et al., 2000). A determinação da estrutura molecular dos canais foi realizada por Roderick MacKinnon utilizando a técnica de cristalografia e raios-X e por este trabalho ele foi laureado com o Nobel de Química de 2003.

Devido ao fato de os canais que possuem um *gate* dependente de voltagem serem os responsáveis pela propagação do impulso nervoso e também devido ao fato de existirem canais que mediam a condução através das sinapses, os canais são componentes muito importantes do sistema nervoso. Além disso, uma grande maioria das toxinas, tanto ofensivas como defensivas, agem de forma a parar o sistema nervoso de seus predadores (ou presas), o que é feito modulando a condução através de canais iônicos (Lee, et al., 2004) (Wang, et al., 2007) (Wee, et al., 2007) (Wee, et al., 2010). Esses canais também são os componentes chave de uma grande variedade de processos biológicos que envolvem rápidas mudanças na célula, como a contração muscular do coração, transporte epitelial de nutrientes e íons, entre outros processos (Voet, et al., 2002).

Na busca por novas drogas os canais iônicos também são um alvo freqüente, especialmente devido ao seu papel importante em muitos processos biológicos. Atualmente sabe-se que existe cerca de 300 tipos diferentes de canais iônicos em uma única célula. Estes podem ser classificados de acordo com o tipo do mecanismo de abertura e fechamento (*gating*), as espécies de íons que transportam e o número de poros. Os mais estudados são os canais dependentes de voltagem, que se abrem e se fecham em resposta ao potencial da membrana (Voet, et al., 2002). Porém a lista de tipos de canais é bastante extensa e neste trabalho discutiremos com um pouco mais de detalhes apenas os canais de potássio K_{2P} .

Rafael C. Bernardi

11

1.4 – CANAIS DE POTÁSSIO K $_{2P}$.

Canais de potássio de resposta (conhecidos também como canais de repouso ou em inglês como: *background, leak* ou *baseline potassium channel*) são poros transmembranares que são constitutivamente abertos em repouso e são fundamentais para função neural (Honoré, 2007) (Goldstein, et al., 2001). A atividade destes canais durante o repouso leva a membrana ao seu potencial de equilíbrio de cerca de -90mV e portanto tende a reduzir a excitabilidade (Dedman, et al., 2008). Estes canais e sua regulação por segundos mensageiros, bem como agentes farmacológicos, são importantes para ajustar o potencial de repouso da membrana, a duração do potencial de ação e consequentemente a transmissão de sinal através da membrana (Honoré, 2007) (Alloui, et al., 2006) (Bayliss, et al., 2008).

Os canais de potássio de repouso são compostos por duas subunidades de proteína (K_{2P}) e já foram conhecidas como subunidades KCNKx ou também como canais TWIK (Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying K+) (Honoré, 2007) (Treptow, et al., 2010). A classe de canais K_{2P} em mamíferos é composta atualmente por 15 membros. Mas apesar destas subunidades apresentarem o mesmo arranjo estrutural, com quatro segmentos em α -hélice transmembranar e dois domínios formadores do poro, criando dois poros na região do filtro de seletividade, eles compartilham muito pouca identidade na seqüência de aminoácidos na região fora do poro (N, et al., 2005). A Figura 4 foi extraída do trabalho de revisão escrito por Honoré (Honoré, 2007) e ilustra a organização e a diversidade dos canais K_{2P} .

Rafael C. Bernardi

12



Figura 4: Diversidade e propriedades estruturais dos canais K_{2P} humanos. 4a: Representação da topologia dimérica dos canais K_{2P} . Cada subunidade contém quatro seguimentos transmembranares e dois domínios formadores de poro arranjados em tandem. 4b: Árvore filogenética dos canais K_{2P} humanos, indicando a nomenclatura, localização cromossômica e função destas proteínas. 4c: A sequência de assinatura da região do filtro de seletividade de um canal de potássio é indicada nesta ilustração.

Neste trabalho vamos estudar um dos canais K_{2P}, o TREK-1 (TWIK-Related K+ channel) um canal mecanosensível que recentemente teve sua importância observada em diversos efeitos fisiológicos (Honoré, 2007). A inativação do gene que expressa o TREK-1

em ratos revelou um potencial envolvimento dos canais K_{2P} em uma gama de doenças neuronais, incluindo dor, isquemia, epilepsia e depressão (Honoré, 2007) (Alloui, et al., 2006). Além disso, o TREK-1 mostrou respostas farmacológicas únicas, como a modulação por lipídios e por anestésicos gerais e locais entre outros agentes (Bayliss, et al., 2008) (Harinath, et al., 2005) (Maingret, et al., 2000) (Patel, et al., 1999) (Punke, et al., 2003) (Terrenoire, et al., 2001) (Voloshyna, et al., 2008).

Quanto à sua ativação, o canal TREK-1 pode ser ativado por estímulo mecânico, acidose intracelular e aumento de temperatura, demonstrando que os canais K_{2P} são caracterizados por um mecanismo de *gating* diferenciado dos conhecidos atualmente (Honoré, 2007). Estudos realizados até agora mostram que a região C-terminal destes canais é a região de maior importância para o mecanismo de modulação do canal (Honoré, 2007).

O canal TREK-1 também apresenta um comportamento atípico em termos de sua farmacologia, pois ele é resistente a todos os bloqueadores clássicos de canais de potássio. Entretanto, ele é inibido por diversos outros agentes farmacológicos, como antidepressivos inibidores da recaptação seletiva de serotonina (SSRI) como as fluoxetinas (Honoré, 2007). O TREK-1 é aberto por outra classe importante de fármacos, os anestésicos gerais voláteis (Bayliss, et al., 2008) (Kim, 2005) (Terrenoire, et al., 2001). Doses clínicas de clorofórmio, dietil-éter, halotano e isoflurano são capazes de abrir o TREK-1 (Patel, et al., 1999). Anestésicos gasosos, conhecidos por sua potente ação analgésica, seus efeitos neuroprotetores e de euforia, também atuam sobre o TREK-1 em doses clínicas (Honoré, 2007). O domínio da região C-terminal do TREK-1 também parece ser a região mais importante na modulação do canal por anestésicos, uma vez que se este domínio não é expresso no canal o efeito anestésico não é mais notado (Honoré, 2007).

Rafael C. Bernardi

14

Para estudar a importância fisiopatológica do TREK-1 in vivo alguns trabalhos têm apresentado estudos com ratos onde foram realizadas mutações deletérias em seus genes por técnicas de recombinação (Patel, et al., 1999) (Harinath, et al., 2005). Os ratos mutantes TREK-1^{-/-} são saudáveis, férteis e não apresentam nenhuma anormalidade visível. Entretanto, usando estes ratos *knockout* como modelo, estudos recentes mostraram um papel fundamental do TREK-1 na anestesia, neuroproteção, na percepção da dor e na depressão (Honoré, 2007).

Estudos preliminares já haviam indicado que a abertura do TREK-1 por anestésico geral volátil induzia a hiperpolarização da célula. Nos trabalhos com os ratos TREK-1^{-/-}, estes se mostraram menos sensíveis ao clorofórmio, halotano, sevoflurano e desflurano do que ratos *wild-type* (Honoré, 2007). Uma concentração de halotano que é suficiente para anestesiar 100% de uma população de ratos *wild-type* não tem efeito em uma população de ratos *knockout* (Patel, et al., 1999). Apesar disto, a forma como estes fármacos afetam este canal ainda é uma questão que permanece em aberto. Os resultados mostram que a abertura do TREK-1, junto com a modulação de outros alvos como receptores GABA_A, parece ser fundamental para o mecanismo de anestesia geral (Honoré, 2007).

1.5 – O EFEITO ANESTÉSICO:

O efeito anestésico é conhecido como a condição onde as sensações são bloqueadas temporariamente por um agente farmacológico. Este efeito pode ser de duas formas principais: anestesia geral, onde há total perda de consciência, ou anestesia local, que representa a perda de sensação de uma determinada parte do corpo. Como discutido, o transporte de íons através da membrana celular é responsável pela transmissão dos

impulsos nervosos e logo pela sensação de calor, dor, entre outras. Por esta razão este tipo de transporte tem que ser bloqueado para que seja observado o efeito anestésico. Porém pouco se sabe sobre o mecanismo de ação destes fármacos no nível molecular e este problema tem sido alvo de diversos trabalhos nas últimas décadas.

1.6 – ANESTESIA GERAL:

A anestesia geral é uma técnica muito utilizada em procedimentos médicos e é conhecida por um estado total de inconsciência produzido por um agente anestésico geral (GA – do inglês: *General Anesthetics*). Em geral, em um procedimento cirúrgico uma grande variedade de fármacos é dada ao paciente para garantir a inconsciência, amnésia e a analgesia. Entretanto o grande responsável pelo efeito é o anestésico geral cujo mecanismo de ação permanece não compreendido.

Existem dois tipos principais de anestésicos gerais, os inaláveis e os injetáveis, sendo que comumente estas duas formas são combinadas (Alfred, et al., 2003). Os inaláveis são substâncias que podem ser líquidos voláteis ou gases e são geralmente aplicados utilizando um equipamento especial para anestesia. Muitos compostos já foram utilizados como anestésicos inaláveis, porém poucos continuam em uso, sendo o desflurano, isoflurno e o sevoflurano, que são gases anestésicos, os mais utilizados hoje em dia. Outros anestésicos que já foram muito utilizados são os anestésicos líquidos voláteis, principalmente o halotano, o enflurano e o metoxiflurano, porém seu uso é pouco popular hoje em dia. Esta classe de fármacos é composta por moléculas geralmente muito hidrofóbicas e são substâncias que em condições normais são gases ou líquidos que evaporam muito facilmente, de forma a serem administrados pelas vias aéreas (Alfred, et al., 2003).

Rafael C. Bernardi

16

Os anestésicos injetáveis são utilizados para a indução e manutenção do estado de inconsciência. Por serem mais rápidos, são muito utilizados para a indução do efeito anestésico e combinados com os inaláveis que ajudam a manter o estado de anestesia. Os fármacos mais utilizados como anestésicos gerais injetáveis são: o profolol, etomidatos, metohexital, tiopentona, benzodiazepinas, ketaminas.

Quanto ao mecanismo de ação, não existe um consenso sobre a forma de atuação destes fármacos no nível molecular. Duas teorias principais se destacam: a teoria do lipídio e a teoria dos canais iônicos (Voet, et al., 2002). A teoria do lipídio foi primeiramente proposta por Overton e Meyer que postularam que os anestésicos gerais exercem sua atividade agindo apenas na membrana plasmática, aumentando a sua fluidez (Alfred, et al., 2003) (Hemmings, et al., 2005). Esta idéia é suportada pela evidencia de que a potência destes fármacos tem uma correlação muito direta com a solubilidade destas moléculas. Esta teoria hoje já não é mais muito aceita, uma vez que o papel dos canais iônicos no efeito anestésico tem se mostrado fundamental. Estudos recentes mostram que os anestésicos gerais inibem a função de diversas proteínas de membrana e também excitam a atividade de outras, como o canal de potássio TREK-1 (Hemmings, et al., 2005) (Patel, et al., 1999) (Honoré, 2007).

1.7 – ANESTESIA LOCAL:

Os anestésicos locais (LA – do inglês: *Local Anesthetics*) são fármacos de efeito reversivo, que inibem a propagação de sinais através de células do sistema nervoso. Esta inibição pode provocar redução ou perda da sensibilidade de uma determinada região do corpo. Estes fármacos estão divididos em duas classes: amino-amidas e amino-ésters,

sendo ambos sintéticos e suas estruturas estão relacionadas à cocaína (Ruetsch, et al., 2001).

A fim de induzir a anestesia local, diversos fármacos podem ser empregados, sendo que alguns dos mais comuns são (Alfred, et al., 2003):

- 1. Anestesia superficial benzocaína, butacaína, cocaína, entre outros;
- 2. Anestesia espinhal lidocaína, piperocaína, procaína, entre outros;
- 3. Anestesia de bloqueio nervoso procaína, tetracaína, entre outros;
- 4. Anestesia epidural bupivacaína, etidocaína, lidocaína, entre outros;
- 5. Anestesia por infiltração butanilicaína, prilocaína, entre outros;

Quanto ao uso deste tipo de substância existem registros da utilização de inibidores de dor, como os LA, desde a Grécia antiga, através da aplicação de uma raiz com capacidade de aliviar a dor. Esta raiz é citada na obra Ilíada de Homero, mas também Dioscórides menciona o uso de óleos e bálsamos para a anestesia de partes do corpo (Alfred, et al., 2003). Já os LAs que utilizamos hoje têm sua origem nas Américas, onde povos andinos do Peru e da Bolívia, como os Incas, mascavam folhas de coca. O costume ainda persiste e lhes dá a sensação de bem-estar, tornando-os capazes de trabalhos mais árduos, evitando a sensação de dor por fadiga muscular, sede e fome.

Apesar de conscientes do uso da folha da coca, conquistadores espanhóis não estudaram as propriedades da planta, o que veio a ser feito somente em 1855-60 por um estudante de doutorado da Universidade de Gottingen (Alemanha). Albert Niemann isolou a cocaína do arbusto *Erythroxilon coca*, publicando como seu trabalho de doutorado em 1860 (Alfred, et al., 2003).
A partir daí diversos trabalhos começam a surgir estudando a cocaína. O primeiro que sugere o uso desta molécula como anestésico local foi von Anrep, que por volta de 1880 estudou sua farmacologia. Em 1884, Sigmund Freud relatou seu efeito fisiológico e Köller demonstrou sua utilidade na oftalmologia. Em 1904-05, Fourneau sintetiza a amilocaína, a partir da disjunção da molécula de cocaína, surge então o primeiro LA derivado da cocaína. Ainda em 1905 é feita a procaína e então começam a surgir diversos anestésicos. Em 1943 Löfgren e Lundqvist sintetizam a lidocaína, muito usada até hoje e mais conhecia sobre o nome comercial Xylocaína (Alfred, et al., 2003) (Ruetsch, et al., 2001).

Quanto à sua estrutura, os anestésicos locais são semelhantes à cocaína e podem ser representados por uma fórmula geral conhecida como grupo anestesiofórico, dada pela Figura 5. Os LA são pequenas moléculas anfifílicas que em sua maioria possuem um grupamento amina ionizável em um pH entre 7,0 e 9,0 (Fraceto, et al., 2006).

Um detalhe importante, é que para terem atividade anestésica, estas moléculas devem ter equilíbrio entre as partes hidrofílica e lipofílica (Alfred, et al., 2003). Além disso, em todos os anestésicos locais dos tipos éster e amida, o grupo carbonila é ativado pela presença de carga positiva parcial no átomo de carbono. Isso é possibilitado pelas ligações conjugadas, que permitem uma deslocalização das nuvens eletrônicas π do anel aromático até o oxigênio da carbonila, como na Figura 6.

cadeia centro centro lipofílico : intermediária : hidrofílico

Rafael C. Bernardi

Figura 5: Fórmula geral dos anestésicos locais. Fonte: A. Korolkovas, J. H. Burckhalter; Química Farmacêutica – cap. 21 – Guanabara – 1988.



Figura 6: Deslocalização da nuvem eletrônica nos anestésicos locais. O modelo acima representanda a tetracaína.

Este átomo (oxigênio da carbonila) adquire uma carga parcial negativa, o que dá origem à carga parcial positiva no carbono da carbonila (Korolkovas, et al., 1988). Na tetracaína, devido à presença de um grupo doador de elétrons na posição *para* do anel fenílico, existe ainda um aumento da polarização entre o oxigênio e o carbono da carbonila. Então neste caso acredita-se que haverá uma união mais firme entre o composto (tetracaína) e o aceitador de ligações de hidrogênio, o que prolongará a ação do anestésico (Bernardi, et al., 2006), já que a região se encontrará mais polarizada. Com isso acredita-se que a ação anestésica dependeria da ligação dos LA com um receptor na membrana, como está indicado na Figura 7, sendo que o receptor poderia ser uma proteína transmembranar ou mesmo os fosfolipídios da membrana (Fraceto, et al., 2006).

Quanto ao seu mecanismo de ação existem muitas divergências, principalmente quanto ao local onde agem e qual é a forma ativa, a neutra ou a protonada. Bastante aceito atualmente é o modelo que propõe que os anestésicos locais atravessam a membrana na forma não-ionizada, mas interagem com o sítio receptor situado na membrana neural na forma ionizada, e assim estabilizam o potencial da membrana, bloqueando a condução

nervosa (Figura 7 e Figura 8) (Ruetsch, et al., 2001). A condução nervosa é feita através da polarização entre o meio interno e externo a célula, controlando o fluxo de íons através da membrana. O que os LA fazem, é em suma, despolarizar a membrana neural, bloqueando a transmissão do impulso nervoso (Auger, et al., 1988). Acredita-se que esta despolarização se dê por interferência no fluxo de íons Na⁺ e K⁺ através de canais iônicos da membrana. Ou seja, não há desenvolvimento de um potencial elétrico negativo para a transmissão de um impulso (Fraceto, et al., 2006) (Ruetsch, et al., 2001).



Figura 7: Ligação da molécula da tetracaína protonada ao receptor por meio de: E, forças eletrostáticas; D, interação dipolo-dipolo; V, forças de van der Waals e contatos hidrofóbicos; H, ligações hidrogênio; CT, transferência de carga.



Figura 8: Propagação do impulso nervoso. Fonte: A. Korolkovas, J. H. Burckhalter; Química Farmacêutica – cap. 21 – Guanabara – 1988.

Um fator que indicaria que tal teoria é plausível é que os anestésicos locais costumam ser ineficazes em áreas inflamadas, devido ao pH mais ácido nestas áreas, o que facilita a

ionização das moléculas do anestésico e, conseqüentemente, dificulta sua penetração nas fibras nervosas (Korolkovas, et al., 1988).

Outra hipótese mais recente é a de que o sítio de ligação seria em canais de sódio na membrana celular neural. Quando o fluxo de sódio é interrompido, o potencial de ação não surge e o sinal não é conduzido através do neurônio. O mecanismo mais aceito atualmente seria de que os anestésicos locais entram na membrana e dentro dela se ligam a uma porção do canal de sódio, inibindo o mesmo, mantendo-o fechado para o fluxo de íons (Fozzard, et al., 2005).

Outros trabalhos também indicam que os LAs desorganizam a estrutura da bicamada lipídica o que aumenta a permeabilidade de água nas membranas. Isto poderia afetar o efeito anestésico e também aumentar sua toxidade (Shibata, et al., 1995) (Auger, et al., 1988).

1.8 – TÉCNICAS COMPUTACIONAIS:

Simulações computacionais de diversos tipos de sistemas, em especial de sistemas biológicos, são cada vez mais comuns na literatura. Porém apesar de milhares de artigos sobre o assunto mostrarem como se comportam os mais diferentes sistemas, não se sabe ao certo exatamente o quanto disso é realmente uma boa aproximação da realidade. Na simulação de moléculas, diversas propriedades físico-químicas já são obtidas com boa precisão a partir de métodos computacionais. Mas ao tentarmos falar nestas simulações como verdades absolutas, devemos lembrar que uma importante questão precisa ser feita por nós mesmos: *As simulações que fazemos representam realmente a natureza?* Por outro lado, os modelos experimetais também são "modelos" e como tais são também aproximações.

Rafael C. Bernardi

Os avanços dos métodos de modelagem molecular tentando encontrar a ideal representação da natureza passam principalmente pelo avanço dos computadores nas duas últimas décadas. Diversos estudos possíveis hoje em dia, só o são devido ao grande crescimento tecnológico nesta área. Em contrapartida, apesar de termos métodos também muito avançados, vários modelos hoje são na verdade meras adaptações para o computador de equações como as das leis de Newton (publicadas em 1687, em seu trabalho *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*) utilizadas principalmente nos métodos de Dinâmica Molecular (MD – do inglês: *Molecular Dynamics*).

Este avanço está ajudando no desenvolvimento de diversas áreas, como a bioquímica e a engenharia de materiais. Devido à limitação computacional, métodos envolvendo aproximações clássicas para sistemas quânticos, estão se expandindo muito rapidamente. E apesar dos avanços na capacidade de processamento, muitos sistemas que desejamos estudar esbarram na falta de máquinas suficientemente potentes para resolver via mecânica quântica problemas envolvendo grande número de átomos e moléculas. A utilização de cálculos quânticos *ab-initio* (*também chamado de método de primeiros princípios: indica que o cálculo é feito partindo dos primeiros princípios da mecânica quântica, ou seja, desde a equação de Schroedinger até a obtenção da grandeza física que se deseja, tendo como base apenas a massa e a carga das partículas, além é claro da constante de Plank*) para calcular, por exemplo, os potencias harmônicos entre átomos em moléculas orgânicas pequenas, com menos de 30 átomos, podem levar até mesmo alguns dias, dependendo do método de aproximação utilizado no cálculo. Os tempos computacionais envolvidos em uma abordagem puramente quântica, para sistemas moleculares de grande porte, são absolutamente proibitivos (Mundim, 2002).

Rafael C. Bernardi

Quanto às metodologias para o procedimento de simulação computacional, estas nos remetem aos princípios gerais das dinâmicas clássicas e quânticas e aos princípios de extremos envolvendo grandezas físicas. Isto dá origem a diversos métodos, sendo que os por nós utilizados foram os de mecânica molecular (MM – do inglês: *Molecular Mechanics*), o método semi-empírico PM3 (*Parameterized Model 3*), o método ab-initio DFT (*Density Functional Theory*) com o funcional B3LYP (Becke 3 – Lee-Yang-Parr) na base 6-31G** e o método CPMD (*Car-Parrinello Molecular Dynamics*), que também tem origem na DFT mas utiliza ondas planas como base.

Diversos softwares são encontrados, para o cálculo de propriedades atômicas e moleculares. Dentre eles, existem programas livres, os quais podem ser baixados da Internet em diversas *home-pages*, e que, em grande parte, são aprimorados por seus próprios usuários, devido ao fato de seu código fonte estar aberto para qualquer pessoa. Geralmente estes programas são desenvolvidos por grupos de pesquisas de diversos institutos. Existem também softwares pagos, que geralmente possuem generosos guias e interface muito simples com o usuário, porém a um preço fora da realidade da maioria dos grupos de pesquisa de países em desenvolvimento. Estes, também apresentam o problema de serem muito fechados e devemos então confiar em seus cálculos sem saber o que exatamente seus algoritmos fazem, já que em muitos casos seus usuários não podem ter acesso aos seus códigos fonte. Desenvolver um software próprio também é possível, porém bastante complicado, principalmente devido ao tamanho do código que torna praticamente proibitivo uma pessoa ou um pequeno grupo fazê-lo de maneira eficiente.

Neste trabalho empregamos diversos pacotes computacionais, sendo que para os cálculos de dinâmica molecular clássica utilizamos o GROMACS e o NAMD, com os campos de forças GROMOS e CHARMM respectivamente. Para cálculos de dinâmica molecular Rafael C. Bernardi 24

híbrida (QM/MM) utilizamos uma compilação que integra o GROMACS com o CPMD. Além disso, para construção dos parâmetros para os campos de forças de fármacos, utilizamos os pacotes Ghemical e Gaussian 2003, sendo este último utilizado para os cálculos de estrutura eletrônica das moléculas para obtenção dos parâmetros de carga.

O desenvolvimento desta tese também envolveu a montagem dos recursos computacionais utilizados no Brasil, que incluíram a construção, configuração e manutenção de clusters de computadores. A primeira versão que montamos e configuramos em 2007 possuía oito nós Intel Pentium Dual Core, totalizando 16 processadores, já utilizando um sistema de filas e gerenciamento como os de grandes supercomputadores. No decorrer do tempo a capacidade computacional do grupo foi crescendo e passamos a utilizar computadores Intel Core2Quad, aumentando os recursos para 40 processadores, todos conectados por uma rede de ethernet Gigabit. Com o aumento da capacidade computacional passamos a utilizar máquinas mais avançadas e hoje o cluster, agora conhecido como Jaguatirica, possui pouco mais de 300 processadores Intel Xeon conectados por uma rede ethernet Gibabit, sendo que 96 destes processadores também são integrados por uma rede Infiniband DDR 4X. Esta rede permite a comunicação entre os nós a uma taxa de 20 Gbit/s com uma latência da ordem de 140 ns, permitindo a divisão dos cálculos em mais processadores sem que haja perda na eficiência.

Fora do Brasil foram utilizados recursos de diversos centros de computação que nos cederam horas por meio da nossa interação com o *Center for Modecular Modeling* da *University of Pennsylvania*. Em especial, o supercomputador *BigBen* do *Pittsburg Supercomputer Center* foi bastante utilizado, tendo sido o computador onde a maior parte dos cálculos mais extensos deste trabalho foram realizados.

Rafael C. Bernardi



Figura 9: Foto do cluster Jaguatirica. O cluster possui hoje pouco mais de 300 processadores exclusivos para cálculos de modelagem e dinâmica molecular.

2 – OBJETIVOS:

Propor um mecanismo de ação para os anestésicos a partir de simulação, ainda está além da capacidade computacional que temos nos dias de hoje. Nosso principal objetivo neste trabalho é construir, através de métodos computacionais, modelos que nos dêem uma melhor compreensão do que está ocorrendo em escala atômico-molecular. Modelos estes que possam ser calibrados e comparados com dados experimentais de forma a propor novos experimentos que levem a uma resposta mais completa sobre tal mecanismo.

Para isso estudamos o comportamento de anestésicos locais na interface águamembrana, através de métodos clássicos e quânticos de dinâmica molecular. Também pretendemos investigar o comportamento de anestésicos gerais e locais na presença de canais iônicos transmembranares, a fim de caracterizar uma possível interação entre o anestésico e o canal. Estes estudos pretenderam também trazer duas novas técnicas ao Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular (LMDM – UFRJ), primeiro a simulação através de métodos híbridos utilizando CPMD (*Car-Parrinello Molecular Dynamics*) e mecânica clássica, e em segundo lugar o método de simulação de grandes proteínas em membranas biológicas.

2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1. Simular os anestésicos locais: tetracaína, lidocaína e benzocaína na interface membrana-água para estudar o comportamento do fármaco neste ambiente.
- 2. Com o método híbrido QM/MM (quântico CPMD e clássico de mecânica molecular) estudar o comportamento dos anestésicos locais na interface água-membrana.

- Estudar o efeito da alta concentração de moléculas anfifílicas, como o etanol, no transporte destas moléculas através da membrana biológica.
- Aumentar o nosso conhecimento do mecanismo de *gate* dos canais K_{2P} sob a ação de estímulos que são conhecidos por modular o funcionamento destes canais.
- Investigar modelos do canal de potássio TREK-1 na membrana junto com o anestésico geral isoflurano para estudar o comportamento do mesmo na presença do fármaco.
- Investigar o comportamento do canal de potássio TREK-1 na membrana na presença do anestésico local benzocaína.

3 – METODOLOGIA:

Nos últimos anos os computadores multiprocessados se proliferaram, provocando uma corrida por melhores códigos que fossem eficientes para modelagem molecular em paralelo. Estes avanços levaram a uma onda de novas aplicações para a computação em química. Simulações de sistemas biológicos, antes restritas a pequenos intervalos de tempo e pequenas moléculas passaram a ser possíveis em escalas mais próxima da que ocorrem diversos fenômenos de interesse (Klein, et al., 2008).

Como apresentado na introdução, os métodos de modelagem puramente quânticos são muito poderosos, porém muito caros computacionalmente. Por outro lado os métodos de MM, métodos clássicos, são bastante rápidos mas apresentam uma série de limitações. Para tentar resolver isto foram criados os métodos híbridos de mecânica quântica (QM) e mecânica molecular (MM). A QM resolveria então a parte onde precisamos de maiores detalhes e a parte clássica ficaria responsável pelo restante do sistema.

Apesar dos diferentes nomes e muitas vezes formas complexas de resolver, todos estes métodos na verdade partem de princípios muito bem estabelecidos na física. A seguir, apresentamos com maiores detalhes os métodos que utilizamos para os cálculos neste trabalho:

3.1 – MODELAGEM MOLECULAR CLÁSSICA:

O princípio básico deste método é muito antigo e muito conhecido pelos físicos, e podemos sintetizá-lo em três leis básicas formuladas por Newton e publicadas no ano de

1687 em seu livro "*Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*" (Princípios Matemáticos da Filosofia Natural) da seguinte maneira:

1. Todo corpo continua em seu estado de repouso ou de movimento uniforme em uma linha reta, a menos que seja forçado a mudar aquele estado por forças imprimidas sobre ele.

2. A mudança de movimento é proporcional à força motora imprimida, e é produzida na direção da linha reta na qual aquela força é impressa.

3. A toda ação há sempre oposta uma reação igual, ou, as ações mútuas de dois corpos um sobre o outro são sempre iguais e dirigidas a partes opostas.

A partir destes princípios, sabemos que o movimento de cada átomo está diretamente relacionado ao potencial que é aplicado a ele. Antes porém de definirmos o potencial sobre cada átomo precisamos estabelecer alguns princípios. Na MM, o átomo é representado por um corpo esférico com uma massa particular que, em geral, é igual a sua respectiva massa atômica. E é importante estabelecermos um sistema de coordenadas que relaciona um determinado átomo com os átomos aos quais ele está ligado, criando assim uma relação entre seus vizinhos primeiros, segundos, terceiros e assim por diante. Este sistema de orientação, comumente usado em métodos de modelagem e dinâmica molecular, aparece explicitado na Figura 10.



Figura 10: Sistema de orientação usado na modelagem molecular: 1,2 representa o primeiro vizinho, 1,3 o segundo vizinho e 1,4 representa o terceiro vizinho.

Rafael C. Bernardi

Devemos então, baseados em modelos da mecânica clássica, descrever as propriedades moleculares quânticas em termos de um campo de forças. Como exemplo, as ligações químicas são representadas por potenciais harmônicos, pois em princípio podemos dizer que as moléculas são como uma coleção de massas ligadas por "molas", com suas propriedades representadas através de potenciais harmônicos e anarmonicos (Levine, 2003).

Precisamos então encontrar um conjunto refinado de parâmetros que melhor represente estes potenciais clássicos, a fim de descrever propriedades quânticas. A qualidade de um campo de forças passa necessariamente pela sua sensibilidade em descrever e mapear os diferentes estados conformacionais de energia potencial mínima, local ou global, mesmo estando o sistema molecular em condições críticas e sob a ação de forças externas. E aqui já começamos a ter problemas, pois os métodos clássicos falham em algumas situações importantes, pois suas equações geralmente resolvem problemas para a maioria dos átomos em condições de temperaturas e pressão normais. Então alguns problemas insolúveis para mecânica clássica surgem:

- Prótons podem tunelar através de barreiras de potencial em uma ligação de hidrogênio.
- Hélio líquido a baixa temperatura possui uma alta freqüência de vibração.
- A mecânica estatística do oscilador harmônico clássico difere muito da do oscilador harmônico quântico quando estamos próximos da freqüência de ressonância.

Outro grande problema é que classicamente o número de onda é da ordem de 200 cm⁻¹, porém quanticamente este valor pode ser muito diferente, principalmente em moléculas com átomos de hidrogênio. Este problema específico pode ser solucionado pelo menos por duas maneiras:

 Se estivermos utilizando potenciais harmônicos para simular as ligações químicas, podemos fazer correções na energia interna U e no calor específico C_v, de modo que estes termos sejam escritos na forma:

$$U^{QM} = U^{Cl} + kT \left[\frac{x}{2} - 1 + \frac{x}{e^x - 1} \right]$$
$$C_v^{QM} = C_v^{Cl} - k \left[1 - \frac{x^2 e^x}{(e^x - 1)^2} \right]$$

Deve-se lembrar que se forem calculadas, a energia livre G e a entropia S também devem ter suas equações corrigidas.

2. Podemos tratar as ligações e os ângulos de ligação como vínculos na equação de movimento, sendo assim não precisaremos mais calcular estas vibrações do átomo de hidrogênio, congelando-o e ganhando no mínimo quatro vezes mais velocidade de cálculo em uma MD, pois agora ao invés de passos de 0.5 femtosegundos, daremos passos de dois femtosegundos.

Esta segunda opção é a que está implementada na maioria dos pacotes computacionais utilizados nos cálculos de dinâmica molecular.

Descrição dos potenciais:

Na MM descrevemos a energia na forma Hamiltoniana como a soma da energia cinética com a potencial, sendo que esta parte potencial é descrita pela soma de um conjunto de termos representando cada tipo de potencial usado na representação da molécula:

 $V = V_{str} + V_{bend} + V_{oop} + V_{tors} + V_{LJ} + V_{es}$

Em resumo, os termos da equação acima podem ser divididos em dois grupos de potenciais descritos abaixo:

Potenciais covalentes:

Seguem a lei de Hooke, usada para descrever oscilações, isto se deve, ao fato de os átomos oscilarem próximos a um valor de equilíbrio. Fazem parte deste potencial os seguintes termos:

a. - V_{str} representa a energia necessária para comprimir ou alongar as ligações químicas do tipo covalente, ou seja, depende diretamente do raio entre um átomo e o outro Figura 11. A equação matemática para esta energia potencial é dada, para uma molécula, como a soma das energias potenciais de todos os primeiros vizinhos de cada átomo da mesma, ou seja, todos os átomos j diretamente ligados a cada átomo i. Pois, à temperatura ambiente, os comprimentos das ligações químicas devem oscilar próximos ao seu valor de equilíbrio, obedecendo a uma função aproximada à lei de Hooke, como mostra a equação abaixo:

$$V_{str} = \sum_{1,2} \frac{1}{2} k_{IJ} (l_{ij} - l_{IJ}^0)^2$$

onde I e J representam quais tipos de átomos estão sendo ligados, ou seja, representam valores de referência para os átomos i e j da ligação. Note que a constante de força k_{IJ} e o comprimento de referência I_{IJ}^0 , são valores fixos para cada tipo de ligação. Por exemplo, no $CH_3 - CH_2 - CH_3$, temos valores fixos de referência para ligações entre carbono e carbono, e carbono e hidrogênio. A constante de Hooke (k_{IJ}) pode ser calculada, por exemplo, analisando-se o espectro de absorção de infravermelho da molécula, comparando-o com as energias potenciais obtidas para cada estado vibracional, utilizando-se a equação de Schroedinger.



Figura 11: Representação da ligação direta entre um átomo e outro.

b. – O termo V_{bend} é a contribuição na energia potencial que representa o ângulo entre as ligações, como na Figura 12:



Figura 12: Representação do ângulo entre as ligações de três átomos.

Este termo é dado para a molécula como sendo a soma de todas as energias potenciais $V_{bend,ijk}$ possíveis na interação de cada átomo i com os seus dois primeiros vizinhos j e k, onde:

$$V_{bend,ijk} = \frac{1}{2} k_{IJK} \left(\theta_{ijk} - \theta_{IJK}^0 \right)^2$$

com k_{IJK} é a constante de restituição do ângulo de equilíbrio θ^0_{IJK}

c. – Para representar, e manter a estrutura tridimensional de alguns agrupamentos de átomos da molécula, temos a contribuição no potencial devido ao ângulo dihedral impróprio V_{oop} , que nos mostra a contribuição, na energia potencial, do ângulo ω de desvio de um

plano, formado pelos átomos i,j,k, em relação ao outro, formado pelos átomos j,k,l, como na Figura 13.

Para representar matematicamente a energia potencial, devemos somar todos os potenciais de cada par de planos, com a equação para representar cada um destes potenciais de Hooke, como sendo do tipo:

$$V_{oop} = \frac{1}{2} k_{oop} (\omega_{oop} - \omega_{ref})^2$$

onde, k_{oop} é uma constante parametrizada a partir de valores empíricos.



Figura 13: Representação do ângulo formado entre dois planos formados por quarto átomos da molécula.

d. – V_{tors} é o termo da contribuição torsional, que representa os movimentos harmônicos em torno das ligações químicas, como mostra a Figura 14. Ele descreve a simetria rotacional pelas barreiras e mínimos de energia para a torção de cada ligação química com liberdade de rotação, sendo dado matematicamente como a soma dos potenciais de todos os possíveis ângulos de torção da molécula V_{tors,ijkl}, que por sua vez é dado por:

$$V_{tors,ijkl} = \frac{1}{2} [V_1(1 + \cos \varphi) + V_2(1 - \cos 2\varphi) + V_3(1 + \cos 3\varphi) + \cdots]$$

Onde φ é o ângulo dihedral próprio (como na Figura 11), e V₁, V₂, V₃ são parâmetros definidos dependendo de quais tipos de átomos são i, j, k e l, que levam a perfis de potencial em que os mínimos e máximos não têm necessariamente os mesmos valores.



Figura 14: Representação do ângulo de torção em torno de uma ligação química, formado por dois planos em quatro átomos em sequência na estrutura da molécula.

Potenciais não-covalentes:

a. – Potencial de van der Waals: Quando temos átomos não ligados covalentemente, podemos tratar suas ligações por potenciais efetivos, compostos por termos de curto e longo alcance, o que inclui a repulsão das nuvens eletrônicas, a atração de van der Waals e o termo eletrostático de Coulomb. Exceto os três primeiros vizinhos quimicamente ligados, cujas interações são tratadas por potenciais harmônicos, a interação de cada átomo com os outros átomos da molécula é também descrita por termos de Lennard-Jones e Coulomb. O termo de Lennard-Jones (muitas vezes também chamado de termo de van der Waals) V_{LJ} é usualmente dado como a soma das interações envolvendo todos os possíveis vizinhos a partir do terceiro (1,4, 1,5, 1,6, ...), ou seja:

$$V_{LJ} = \sum_{1,>3} \varepsilon_{IJ} \left[\left(\frac{R_{IJ}}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{IJ}}{R_{ij}} \right)^6 \right]$$

onde: R_{ij} é a distância entre os átomos i e j, R_{IJ} é o valor parametrizado para a distância e ε_{IJ} é o parâmetro que fornece o valor de $V_{LJ,ij}$ que tem mínima interação de Lennard-Jones na curva do poço de potencial. A curva do potencial de Lennard-Jones e uma representação esquemática do tipo de interação é apresentada na Figura 15.



Figura 15: Representação do termo de potencial de Lennard-Jones.

Nota-se que o potencial de Lennard-Jones é representado por um termo atrativo com potência 6 e outro repulsivo com potência 12. O termo repulsivo é atribuído à combinação da repulsão interatômica com o princípio de exclusão de Pauli. Este termo é de curtíssimo alcance, da ordem de 5 Å, de maneira que a energia potencial aumenta rapidamente com a aproximação entre os núcleos atômicos devido a não interpenetração dos átomos não ligados covalentemente e ao fato do diâmetro atômico ser finito e quase invariável. O termo atrativo surge atribuído a pequenas flutuações na distribuição de cargas do átomo na presença de outro, o que induz um dipolo elétrico (em alguns casos até mesmo quadrupolo elétrico) em sentido oposto, fazendo surgir assim uma interação atrativa dipolo-dipolo, sendo esta interação conhecida como termo de dispersão de London.

Na química, o potencial de van der Waals refere-se originalmente a todas as formas de forças intermoleculares, porém com o passar dos anos o termo acabou sendo mais relacionado com as forças devido à polarização das mesmas. Potenciais de Keesom, de Debye e o termo de dispersão de London eram nomeados juntos como potencial de van der

Waals em homenagem ao físico holandês Johannes Diderik van der Waals, que foi o primeiro a documentar tais interações em 1873.

Um fato interessante decorrente destas expressões é que podemos ver que a tendência de todos os gases se condensarem a baixas temperaturas, próximas a temperatura de ebulição, é atribuída a forças atrativas que superam a energia cinética das moléculas nessas temperaturas. Esta relação pode ser obtida já que, macroscopicamente, o termo atrativo de van der Waals surge como uma correção da pressão, no tratamento de gases reais, e o termo repulsivo é uma correção na equação de estado dos gases ideais, para considerar o volume excluído no estudo de gases reais.

b. – O termo V_{es} (potencial de interação eletrostática) é comumente dado como a soma das interações eletrostáticas envolvendo todos os pares de átomos, exceto os três primeiros vizinhos de cada átomo da molécula. Este potencial de interação, demonstrado esquematicamente na Figura 16, também é conhecido como potencial de repulsão coulombiana, pois V_{es,ij} é expresso pela equação de energia potencial de Coulomb, isto é:

$$V_{es} = \sum_{1,>3} \frac{Q_i Q_j}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon_r R_{ij}}$$

onde Q_i e Q_j são as cargas líquidas dos átomos i e j respectivamente, R_{ij} é a raio entre os átomos e ϵ_r é uma constante dielétrica.



Figura 16: Representação do termo de potencial de Coulomb. Rafael C. Bernardi

Otimização de Geometria através da MM:

Computacionalmente temos diferentes modos de minimizar a energia de um sistema, porém basicamente o que é feito é se ajustar as coordenadas atômicas de modo a reduzir a energia potencial descrita anteriormente. Os métodos de gradiente são as ferramentas mais comuns para esta função, sendo que os mais conhecidos são o steepest descents, o do *gradiente conjugado*, o de *Newton-Raphson* e o método de *Newton truncado*.

O método *steepest descent* (declive acentuado) foi desenvolvido por Cauchy em 1847. Sua forma é muito conhecida e também bastante simples, porém apresenta um lento caminho de convergência, pois utiliza poucas informações, exigindo apenas as derivadas primeiras para o cálculo. Como o gradiente de uma função é um vetor que aponta na direção de maior crescimento da função, então o que método faz é seguir na direção oposta a do vetor, procurando um ponto de mínimo.

O método do gradiente conjugado é um pouco mais sofisticado, pois além de utilizar a informação sobre a primeira derivada ele "memoriza" o caminho já percorrido o que lhe faz convergir mais rapidamente do que o *steepest descent*. A vantagem maior deste método está no fato que sua formulação garante que a direção do gradiente do novo passo será sempre ortogonal ao gradiente do passo anterior, e assim consequentemente de todos os anteriores. Desta maneira evitamos percorrer o mesmo caminho da minimização mais de uma vez, tentando ir diretamente para o fundo do poço de potencial.

Newton-Raphson já é um método mais complexo que converge em uma forma quadrática, ou seja, em pontos próximos do mínimo o número de dígitos significativos dobra. A idéia do método é de se tomar um valor qualquer para uma variável x, como primeira estimativa para este mínimo. Com este valor calculamos então o valor da função que,

provavelmente, não está no mínimo. Deste ponto, traçamos uma tangente à curva buscando o ponto em que esta tangente corta o eixo x, ou seja, este novo valor de x deverá ser uma melhor aproximação do mínimo, e assim sucessivamente.

Baseado em séries de Taylor, o método de Newton truncado consiste na geração de uma série de problemas linearizados, ou seja, quando tratamos de problemas muito grandes, a solução destes sistemas de equações lineares, juntamente com as repetidas avaliações da matriz de rigidez, tornam o método muito dispendioso computacionalmente. O cálculo das soluções lineares no início das interações não-lineares não precisa de grande precisão, necessidade esta que aumenta na medida em que as interações não lineares vão, cada vez mais, aproximando-se da solução final no equilíbrio. Ou seja, a idéia principal é minimizarmos o trabalho necessário para busca do mínimo quando estivermos longe da posição de equilíbrio.

Dinâmica Molecular:

A dinâmica molecular (MD), nada mais é do que o estudo da evolução temporal de um dado sistema molecular. Este método trata os átomos em um meio contínuo, com as ligações químicas vibrando, ângulos de ligação variando, a molécula rotacionando, e ainda, a molécula como um todo pode, ou não, estar se deslocando no meio, tudo isto dependendo do problema a ser tratado.

A primeira aplicação usando dinâmica molecular consistia de um modelo de esferas rígidas com choques perfeitamente elásticos para representar as interações atômicas, foi desenvolvida por Alder e Wainwright e publicado no Journal of Chemical Physics em 1957. Entre os principais precursores deste método também estão Westheimer, Hendrickson, Wiberb, Allinger e Warshel (Levine, 2003).

Rafael C. Bernardi

Com o passar dos anos o tamanho e a complexidade dos sistemas estudados cresceram muito. Para isto diversos artifícios tiveram de ser criados ou mesmo adaptados para estes estudos. A seguir apresentamos alguns destes mecanismos utilizados em nosso trabalho:

Algoritmo de Verlet:

Desenvolvido pelo físico francês Loup Verlet em 1967 (Levine, 2003), este algoritmo, bem como outros métodos numéricos, resolve as equações de movimento de Newton no formalismo de Hamilton para cada incremento de tempo, para isto baseia-se no método de integração de Euler. Num cálculo de MD a avaliação das forças para obtenção das acelerações é o processo que mais consome tempo computacional, pois temos que efetuar a derivada da função potencial descrita anteriormente na seção de Mecânica Molecular. Assim, a partir destes cálculos, as acelerações podem ser inseridas nas equações de movimento, que por sua vez indicam as trajetórias de cada um dos átomos analisados (Lindahl, et al., 2001).

Um problema deste método é que ele somente funciona para funções suaves, ou seja, funções contínuas das posições atômicas. Quando há truncamento nas interações de longo alcance, o potencial sofre variação brusca no instante em que a distância entre um par de átomos em interação ultrapassa o raio de corte, então a menos que um método de suavização possa ser usado, o tratamento do problema deve ser acoplado a uma análise colisional da dinâmica do sistema (Mundim, 2002).

A integral utilizada pelo algoritmo de Verlet pode ser derivada da expansão de Taylor da trajetória x(t) de uma partícula num tempo t. A expansão de Taylor em torno de um tempo t₀ nos dá:

Rafael C. Bernardi

$$x(t_0 + \Delta t) = x(t_0) + \Delta t x'(t_0) + \frac{1}{2} \Delta t^2 x''(t_0) + \frac{1}{6} \Delta t^3 x'''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

E também:

$$x(t_0 - \Delta t) = x(t_0) - \Delta t x'(t_0) + \frac{1}{2} \Delta t^2 x''(t_0) - \frac{1}{6} \Delta t^3 x'''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

Juntando então as duas equações:

$$x(t_0 + \Delta t) + x(t_0 - \Delta t) = 2x(t_0) + \Delta t^2 x''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

Então, facilmente podemos obter a velocidade:

$$v(t_0) = \frac{x(t_0 + \Delta t) - x(t_0 - \Delta t)}{2\Delta t} + O(\Delta t^2)$$

O cálculo da velocidade é duas vezes menos preciso do que o cálculo das trajetórias. Entretanto, este erro não é acumulado durante o cálculo porque a evolução dos passos não necessita dos valores das velocidades, sendo que esta é calculada diretamente das trajetórias sempre que requisitada.

Algoritmo "summed Verlet" ou "leepfrog":

Este método foi feito como uma forma de se evitar que o incremento dado a cada passo fosse muito impreciso, devido ao fato deste ser muito pequeno comparado à distância entre duas posições. Este algoritmo de meio-passo foi criado a partir de uma modificação do algoritmo básico de Verlet. Então, dando-se passos menores, este algoritmo torna-se menos suscetível a erros e ocupa menos espaço na memória, tornando-o assim mais estável e eficiente. As velocidades nos meio-passos $t + \frac{\partial t}{2}$ e $t - \frac{\partial t}{2}$ podem ser definidas, desprezando-se os termos de ordem superior, como:

$$v\left(t_{0}+\frac{\partial t}{2}\right)=\frac{x(t_{0}+\partial t)-x(t_{0})}{\partial t}$$

E também como:

$$v\left(t_0 - \frac{\partial t}{2}\right) = \frac{x(t_0) - x(t_0 - \partial t)}{\partial t}$$

A propagação das posições é obtida destas equações diretamente, de forma que:

$$x(t_0 + \partial t) = x(t_0) + v\left(t_0 + \frac{\partial t}{2}\right)\partial t$$

Esta equação é mais precisa por não lidar com diferenças entre grandes valores, comparados às pequenas variações nas posições atômicas entre t_0 e $t_0 + \partial t$.

A maior vantagem deste algoritmo talvez seja o fato de as velocidades aparecerem no cálculo das novas posições, o que torna o sistema acoplável a um banho térmico por correções nas velocidades. Controlar as velocidades, neste caso, significa controlar diretamente, além da energia cinética, também a energia potencial e logo a energia total do sistema, pois o potencial é uma função das posições e a variação destas depende necessariamente das velocidades. Então um tratamento estatístico nos leva facilmente a equação:

$$\frac{3}{2}N_{at}kT = \langle \sum_{i=1}^{N_{at}} \frac{1}{2}m_i v_i^2(t) \rangle_{N_{steps}}$$

De onde podemos tirar a temperatura T do sistema. O acoplamento a um banho térmico se dá a partir da comparação da temperatura T a cada ciclo de N_{steps} (este número geralmente varia entre 20 e 50 passos, dependendo do número de átomos do sistema N_{at}), com uma temperatura de referência T_0 . No caso de haver um desvio ΔT muito grande, na maioria das vezes da ordem de 10% de T_0 , então as novas velocidades serão corrigidas por um fator:

$$v_i\left(t + \frac{\partial t}{2}\right) = v_i\left(t - \frac{\partial t}{2}\right) \sqrt{\binom{T_0}{T}}$$

Esta forma simples de banho térmico foi muito utilizada nos primeiros cálculos de dinâmica molecular e continuava a ser utilizada até poucos anos atrás. Entretanto desde a década de 1990 outros métodos passaram a ser mais utilizados, como o de Berendsen, de Andersen's ou o de Nosé e Hoover, que utilizamos na maioria de nossos trabalhos (Nose, et al., 1983). Também o método da dinâmica molecular de Langevin passou a ser bastante utilizado na última década, especialmente em cálculos mais longos de MD, tendo sido por nós utilizados nos cálculos com o canal TREK-1.

O método de Berendsen, um dos mais utilizados em cálculos de MD, é extremamente eficiente para relaxar o sistema para uma temperatura setada como a de equilíbrio, porém uma vez que este equilíbrio é atingido este não é o acoplamento ideal e utilizar um ensemble canônico mais correto é muito importante. Um dos métodos mais avançados para as longas MDs no equilíbrio é o método de Nosé-Hoover.

A idéia deste método é considerar o banho térmico como uma parte integral do sistema, adicionando uma variável artificial \tilde{s} , associada a uma massa fictícia Q > 0, assim como a velocidade $\dot{\tilde{s}}$. A magnitude de Q determina o acoplamento entre o reservatório

térmico e o sistema real e desta forma influencia as flutuações da temperatura. A variável artificial \tilde{s} funciona como um parâmetro de ajuste temporal, mais precisamente o tempo no sistema extendido é esticado por um fator \tilde{s} .

$$d\tilde{t} = \tilde{s}dt$$

Uma vez que no método proposto por Nosé as coordenadas atômicas são idênticas em ambos os sistemas, a equação de movimento do sistema no formalismo de Lagrange para o sistema extendido passa a ser:

$$\mathcal{L} = \sum_{i} \frac{m_{i}}{2} \tilde{s}^{2} \dot{\tilde{r}}_{i}^{2} - U(\tilde{r}) + \frac{1}{2} Q \dot{\tilde{s}}^{2} - g k_{b} T_{0} \ln \tilde{s}$$

Os termos adicionais são incluídos para garantir que o algoritmo reproduza um ensemble canônico onde $g = N_{df}$.

A idéia de um tempo esticado que as equações de Nosé propõem não são muito intuitivas e também são muito complexas de serem aplicadas. A formulação que Hoover sugere, baseado na idéia de Nosé, reformula estas equações em termos das variáveis do sistema real. A transformada proposta segue as seguintes relações:

$$s = \tilde{s}, \dot{s} = \tilde{s}\dot{\tilde{s}}, \ddot{s}^2\ddot{\tilde{s}} + \tilde{s}\ddot{s}^2, r = \tilde{r}, \dot{r} = \tilde{s}\dot{\tilde{r}}, \ddot{r} = \tilde{s}^2\tilde{r} + \tilde{s}\dot{\tilde{r}}^2$$

Que levam a uma nova Lagrangeana e as seguintes equações de movimento de Lagrange:

$$\ddot{r}_i = \frac{F_i}{m_i} - \gamma r_i$$
$$\dot{\gamma} = \frac{-k_B N_{df}}{Q} T(t) \left(\frac{g}{N_{df}} \frac{T_0}{T(t)} - 1\right)$$

Onde $\gamma = \frac{\dot{s}}{s}$. É importante salientar que devemos ter muito cuidado na escolha do valor de Q, uma vez que diferentes valores mudam o ensemble e desta forma podem levar a um acoplamento de temperatura ruim. Este acoplamento não é simples de ser compreendido, mas é a forma mais eficiente de se manter o sistema no ensemble canônico, como desejável na maioria das simulações por dinâmica molecular.

Correções nas velocidades também podem ser muito úteis no início de dinâmicas de modo a aliviar tensões localizadas do sistema. Geralmente as velocidades iniciais são sorteadas assumindo uma distribuição de Maxwell-Boltzmann, porém átomos com velocidades muito superiores aos demais podem atrapalhar a dinâmica, gerando regiões superaquecidas, desta forma, geralmente faz-se necessária uma pequena dinâmica para estabilizar o sistema e então seguir o cálculo.

Dinâmica de Langevin:

Um método matemático aproximado muito utilizado para a dinâmica de sistemas moleculares é o método desenvolvido pelo físico francês Paul Langevin no início do século XX. Esta abordagem é caracterizada pelo uso de modelos simplificados para a contabilização de graus de liberdade através do uso de equações diferenciais estocásticas. A idéia é que um sistema molecular no mundo real provavelmente não está no vácuo. Empurrões de moléculas de solvente ou ar provocam fricções e colisões de alta velocidade coasional e acabam perturbando o sistema. A dinâmica de Langevin estende a dinâmica molecular tradicional para permitir estes efeitos. Além disso, este método permite controlar a temperatura como um termostato, assim simulando o ensemble canônico.

Resumidamente, a dinâmica de Langevin mimetiza os aspectos de viscosidade do solvente. Entretanto este não é um modelo completo de solvente implícito, uma vez que não

leva em conta o efeito hidrofóbico nem o *screening* eletrostático, que são melhores descritos pela equação de Poisson-Boltzmann. A equação de Langevin para um sistema de N partículas com massa *m*, com coordenadas *x*(*t*) é:

$$m\ddot{x} = -\nabla V(x) - \gamma m\dot{x} + \sqrt{2\gamma k_B T m}R(t)$$

Onde V(x) é potencial de interação entre as partículas, T é a temperatura do sistema, Kb é a constante de Boltzmann e R(t) é a função delta que satisfaz as relações:

$$\langle R(t)\rangle=0$$

$$\langle R(t)R(t')\rangle = \delta(t-t')$$

Onde δ é a função delta de Dirac. É importante observar que se o objetivo principal for usar a dinâmica de Langevin como acoplamento de temparatura, como em nosso caso, devemos tomar muito cuidado na escolha do valor da constante γ . Para mantermos o sistema em um ensemble canônico devemos manter o valor da constante γ baixo, uma vez que o crescimento de γ leva a um regime difusivo, como numa dinâmica Browniana.

Solvente na Dinâmica Molecular:

Geralmente quando falamos de dinâmica molecular clássica, estamos interessados em uma simulação de alguma molécula ou de um conjunto de moléculas em um determinado meio. O meio mais estudado certamente é a água, principalmente quando realizamos simulações de interesse biológico. Isto se deve não só ao fato de água ser o maior constituinte de boa parte dos seres vivos, mas também devido à água líquida apresentar características peculiares e até mesmo intrigantes relacionadas, por exemplo, à sua habilidade singular de fazer simultaneamente quatro ligações de hidrogênio, em conjunto com sua baixa massa molecular e aos pequenos momentos de inércia. A água também é

encontrada em abundância ao redor de biomoléculas como proteínas e membranas, controlando sua estrutura, função e reatividade em sistemas biológicos.



Figura 17: Representação em duas dimensões do modelo de condição periódica de contorno utilizado nos métodos de dinâmica molecular.

Simulações em caixas d'água são muito comuns, porém como resolver problemas básicos, como as bordas de uma caixa? Sabemos que quando estamos tratando problemas em nível molecular, com uma pequena quantidade de moléculas (geralmente da ordem de 10⁴), se existisse uma parede nas bordas, haveria interação da água com esta parede, o que não nos interessa. Para resolver este problema, foi proposto então um modelo clássico que minimiza estes efeitos e consiste na aplicação de condições periódicas de contorno, ou seja, os átomos do sistema são simulados em uma caixa rodeada por cópias da própria caixa. Sendo assim é como se não houvesse limite na caixa e a mesma fosse infinita Figura 17. A caixa é construída de modo que as moléculas de água podem entrar e sair livremente de um lado para o outro, mas sempre mantendo uma mesma densidade no meio, ou seja, para cada molécula de água que sai da caixa através de uma parede, outra molécula entra pelo lado oposto, sem que as moléculas sejam quebradas, passando-as sempre inteiras. Existem Rafael C. Bernardi

muitas possibilidades para o formato destas células unitárias, como cúbicas, romboédricas ou octaedros truncados, e geralmente escolhe-se a que minimiza o número de átomos no sistema, principalmente quando temos uma macromolécula solvatada nesta caixa.

Diversas propriedades moleculares podem ser obtidas através de uma simulação em meio aquoso, como: propriedades estruturais de solvatação, ligações de hidrogênio entre soluto-solvente, a área do soluto acessível ao solvente, além do estudo da organização das moléculas de água na vizinhança do soluto e de diversas propriedades deste, como estabilidade conformacional e dinâmica, movimentos em diferentes escalas de tempo e de importância para a atividade, entre outras.

Simulações de Interfaces Biológicas:

A simulação de membranas biológicas sempre foi um dos grandes alvos das técnicas de dinâmica molecular. A escala de tempo acessível nas simulações hoje em dia tem aumentado muito a complexidade dos cálculos realizados. Sistemas envolvendo mais de um tipo de lipídio, além de colesterol, explícitos na simulação estão possibilitando novos estudos muito mais complexos. Porém no começo a simulação de membranas utilizava um conceito muito mais simples.

Neste tipo de estudo simplificado, a membrana é simulada de forma implícita como sendo uma interface entre dois meios. Neste modelo, desenvolvido durante a tese de doutorado do Prof. Pedro G. Pascutti, as constantes de permeabilidade e de permissividade são colocadas para simular um lado de uma interface, simulando o meio exterior a membrana, no caso a água, e para o outro lado, que simula o interior da membrana, são inseridas as constantes equivalentes. Podemos utilizar então o método das cargas imagens para uma análise do deslocamento da molécula dentro da membrana. Isto, a primeira vista, é

uma aproximação muito grosseira da membrana (Figura 18), porém os resultados obtidos são bons, e o método é fisicamente muito simples de ser explicado.



Figura 18: Modelo da interface utilizando método das imagens. Alguns fatores devem ser observados: O potencial em P (meio 1) depende de q e q². O potencial em 2 depende só de q corrigida a descontinuidade dielétrica q². Entre os dois meios os potenciais devem ser iguais. Deve haver continuidade da componente do deslocamento elétrico perpendicular à superfície.

Este método pode ser aplicado a problemas envolvendo cargas na presença de superfícies de meios condutores ou dielétricos. Basicamente, consiste na substituição do problema real composto pelas cargas e a superfície da membrana, por um problema mais simples composto pelas cargas e suas imagens projetadas no interior do meio em questão. O campo elétrico, devido à densidade de cargas induzida na superfície de um meio condutor, ou devido à polarização da superfície de um meio dielétrico, na presença de uma carga q, é aproximado ao produzido por uma carga hipotética q' situada simetricamente em relação à posição onde estaria a superfície. Usa-se então uma abordagem semelhante à utilizada em livros de eletrodinâmica.

Apesar de simples este método apresenta bons resultados, tendo sido utilizado em diversos trabalhos. Um dos trabalhos realizados pelo grupo do Prof. Pedro G. Pascutti é justamente sobre o estudo do *gate* de canais iônicos neste tipo de interface, mais especificamente o *gate* de inativação do canal de sódio (Sirota, et al., 2002). Neste trabalho Sirota construiu um modelo teórico do *gate* de inativação do canal de sódio, mais especificamente do linker L_{III-IV} e realizou cálculos de dinâmica molecular numa interface de membrana implícita, mostrando que este domínio parece ter uma grande importância na inativação do canal.

A simulação de membrana explicita é uma das técnicas mais importantes em dinâmica molecular, tendo grande importância para o estudo de fármacos e também de proteínas, uma vez que uma grande parcela destas possui domínios transmembranares. Quando falamos em membranas explicitas queremos dizer que cada átomo do sistema é simulado. Desta maneira, simulações de bicamadas lipídicas já esbarram na necessidade de computadores poderosos, que tenham capacidade de processar o número gigantesco de átomos. Também nas técnicas para simular as peculiares propriedades termodinâmicas deste tipo de sistema utilizando para isto apenas a mecânica clássica.

Diversos modelos de membrana foram criados nos últimos anos, entre eles um dos modelos mais utilizados foi desenvolvido pelo grupo do prof. Dr. Peter Tielleman da Universidade de Calgary, Canadá. Este modelo segue os procedimentos desenvolvidos na tese de doutorado de Tielleman sob orientação do prof. Dr. H. J. C. Berendsen, um dos "pais" do GROMACS, um dos mais conhecidos softwares de dinâmica molecular. O grupo de Calgary alterou diversos parâmetros a fim de reproduzir propriedades experimentais de membranas biológicas e assim poder organizar modelos confiáveis de simulação. Alterações nos potenciais, principalmente eletrostáticos e de van der Waals, fazem-se necessários para

estabilizar um sistema como este e manter condições periódicas de contorno (Tieleman, et al., 1996), porém por mais modernos que sejam seus métodos ainda estamos um pouco longe de simular membranas explícitas com diversas proteínas e carboidratos cruzando através da mesma, como mostra a ilustração da Figura 19.



Figura 19: Representação da membrana celular. Estão representados nesta figura os fosfolipídios, que são os principais integrantes da membrana, junto com diversas outras biomoléculas.

O estudo de sistemas modelo de membrana pode ser feito com detalhes atômicos através de técnicas como Monte Carlo, dinâmica molecular, dinâmicas estocásticas ou ainda por combinações destas técnicas. A dinâmica de um lipídio, bem como de qualquer outro sistema que se deseja simular, passa primeiramente por uma grande coleta de dados experimentais. Os estudos experimentais nos dão principalmente uma visão estrutural das cadeias fosfolipídicas e de suas propriedades de transporte de pequenas moléculas, ou seja, de sua permeabilidade a outras moléculas, como fármacos, permitindo a entrada ou saída destas moléculas dentro da célula. Estes estudos nos levam a progressos principalmente nas parametrizações dos campos de forças.

Um trabalho importante, que ajudou bastante nos atuais métodos de simulação de membranas foi feito por Jakobsson e Scott em 1996, que revisaram algumas estratégias de simulação de lipídios. Este trabalho discutiu diferentes condições macroscópicas de bordas e propõe a simulação de bicamadas com a aplicação de uma superfície de tensão, como num ensemble NγT. Poderia então surgir uma alternativa aos ensembles Npt e NVT que são mais comuns em simulações. Outros ensembles também foram estudados por Feller e também por Zhang (Feller, et al., 1999) (Zhang, et al., 2007).

Um problema do uso de diferentes ensembles está no fato de que tipicamente são comparados dados obtidos por diferentes experimentos, realizados em diferentes condições. Para ajustar estes parâmetros, diferentes aproximações e parâmetros podem ser comparados fazendo-se uma série de simulações com diferentes parâmetros e condições de contorno alterando-os sistematicamente. Entretanto este tipo de cálculo demasiado exaustivo era proibitivo em termos computacionais. No estudo da DPPC diversas simulações foram realizadas pelo grupo do professor Berendsen, sendo que elas diferem uma da outra com respeito às condições macroscópicas de fronteira, modelo de água utilizado, cargas e também dos parâmetros das interações de Lennard-Jones entre carbonos e água.

Apesar de termos utilizado diversas fontes de parâmetros diferentes para a realização de nossas simulações, a forma que cada grupo utilizou para obter estas topologias não é muito diferente uma da outra. Seguindo como exemplo o modelo da DPPC feito pelo grupo

Rafael C. Bernardi

do Dr. Tieleman, tentaremos a seguir explicar algumas das complicações que envolvem a parametrização de uma membrana lipídica (Tieleman, et al., 1996).

Num dos primeiros estudos de membrana realizados com detalhamento atômico, um sistema contendo 64 lipídios e 736 moléculas d'água foi utilizado na fase gel a uma temperatura de 335K (Tieleman, et al., 1996). Para forçar o sistema a se manter nesta fase gel três ajustes fundamentais foram feitos: os parâmetros de Lennard-Jones das interações CH₂-CH₂ e CH₃-CH₃ foram alterados, os diedros do campo de forças GROMOS foram trocados por funções de potenciais diedrais de Ryckaert-Bellemans e as cargas das cabeças foram divididas por dois para diminuir as interações entre estes grupos. Isto poderia compensar então a perda no potencial dielétrico causado pela não polarizabilidade do modelo de água utilizado. Entretanto, como a redução das cargas não é a mais elegante, outras modificações foram propostas pelo grupo.

Alterações no campo de forças:

1. Cargas:

Praticamente em todos os campos de forças modernos as cargas utilizadas são derivadas de cálculos quânticos *ab-initio*. No caso do campo de forças para o DPPC e POPC do grupo do Dr. Tieleman, os parâmetros são derivados do trabalho de Chiu (1995) com algumas correções através de cálculos *ab-inito*. Modelos com estas cargas e com o padrão de cargas do campo de forças GROMOS, já citado anteriormente, foram testados por este grupo de modo a obter uma comparação dos termos para um mesmo sistema molecular.

2. Parâmetros de Lennard-Jones para interações entre água e metil ou metileno:

Nas primeiras simulações dois diferentes conjuntos de parâmetros de Lennard-Jones foram utilizados para estas interações: os parâmetros publicados por Chiu em 1995 e mais
recentemente o conjunto derivado do estudo da interface decano/água feito por Van Buuren em 1993. Van Buuren e seus colaboradores examinaram cinco diferentes valores para o parâmetro ε nas interações Ow-CH₂ e Ow-CH₃, isto foi feito devido ao fato do valor original implementado no campo de forças GROMOS resultava na solubilidade do decano em água de maneira muito distante dos experimentos. As interações Ow-CH₂ e Ow-CH₃ são consideradas um ponto de fundamental importância na interface água membrana (Tieleman, et al., 1996) (Marrink, et al., 1996).

3. Modelo de água:

Diversos modelos de água foram utilizados nos testes de simulação da interface água/lipídio, sendo que os modelos que se saíram melhor foram o SPC, o SPC/E e o TIP. Apesar de cada um destes modelos de água apresentar diferenças ínfimas entre si quando analisamos uma única molécula, esta diferença torna-se bastante significativa e influente quando tratamos de uma quantidade considerável de moléculas como em nosso sistema.

Focando nos modelos SPC e SPC/E, existem muitas razões para preferirmos um ao invés do outro. O modelo SPC/E foi originalmente desenvolvido devido ao fato de seu predecessor não fornecer corretamente as auto-energias devido à polarização. Este modelo fornece uma melhor densidade, função de distribuição radial, constante de autodifusão e constante dielétrica do que a SPC. Porém, infelizmente, um modelo com poucos parâmetros como o SPC ou o SPC/E não pode reproduzir todos os experimentos observados com valores exatos, e para se chegar as melhorias citadas o potencial termodinâmico para o SPC/E somente será correto se sua auto-energia de polarização for aplicada, ou seja, se for posta "a dedo" nas simulações. Também devemos lembrar que a energia livre efetiva do SPC/E é muito baixa (-27,6 kJ/mol) comparada a do modelo SPC (-24,3 kJ/mol), sendo que este último está mais próximo de valores experimentais (Marrink, et al., 1996). Isto tudo, Rafael C. Bernardi

indica que o estado líquido é termodinamicamente muito mais favorável para o SPC/E, porém como em nosso caso a água está em equilíbrio com diferentes ambientes, a solubilidade torna-se muito importante para o bom comportamento das interfaces. Estes resultados levaram então a sugestão de que o modelo SPC seria mais confiável quando trabalhamos com lipídios do GROMOS (Tieleman, et al., 1996).

4. O tratamento eletrostático:

As interações eletrostáticas requerem um cuidado especial. Inicialmente nos estudos de bicamadas lipídicas foram utilizadas funções de corte cilíndricas, método que foi usado devido ao fato de abancar todas as interações eletrostáticas entre pares no volume estudado. As interações eletrostáticas com o cilindro são somadas diretamente e a parte restante do sistema é tratada usando uma solução analítica da equação de Poisson. A contribuição desta parte restante torna-se insignificante e é então desconsiderada. Este método requer uma simetria cilíndrica, o que o torna indesejável para o estudo de bicamadas com outras moléculas e também muito custoso computacionalmente.

Métodos alternativos incluem métodos como a soma de Ewald ou condições estocásticas de contorno com métodos rápidos de expansões de multipólos. Este último método foi utilizado por Heller em 1993 para uma simulação contendo 200 moléculas de POPC. Os métodos de lattice-sum como o da soma de Ewald apresentam uma desvantagem por realçar artefatos utilizados nas condições periódicas de contorno, sendo que isto pode, ou não, ter uma grande importância nos resultados finais (Tieleman, et al., 1996).

Para sistemas de lipídios com carga total neutra um critério simples de potencial de corte (*cut-off*) para as interações eletrostáticas era, até pouco tempo, o método mais usado. Os métodos cut-offs introduzem valores indesejáveis nas soluções com íons, mas se o raio

do corte é bastante grande (valores maiores que 1.8 nm), este método parece trabalhar bem com as fosfatidilcolinas.

O método mais utilizado atualmente para o cálculo eletrostático é o PME (*Particle Mesh Ewald*) que é derivado do método da soma de Ewald. Este método é utilizado para computar a energia de interação, especialmente a energia eletrostática, entre sistemas periódicos, como cristais. A soma de Ewald é um caso especial, no espaço de Fourrier, da soma de Poisson que é feita no espaço real. A maior vantagem desta aproximação é que no espaço de Fourrier a soma converge de forma mais rápida do que no espaço real para interações de longo alcance, como as interações eletrostáticas. Como a energia eletrostática é constituída por interações de curto e de longo alcance, os códigos de MD costumam decompor o cálculo eletrostático em dois domínios. No primeiro, para interações de curto alcance, o cálculo é feito de forma direta pela equação de Coulomb. A partir de um determinado raio o software utiliza o método de Ewald no espaço de Fourrier, que apresentará maior eficiência para o cálculo eletrostático de longo alcance.

Condições de contorno macroscópicas (a escolha do ensemble):

A maioria dos estudos de dinâmica molecular de lipídios e sistemas de interesse biológico usam condições de contorno a pressão constante em um ensemble NpT ou a volume constante num ensemble NVT.

O primeiro método permite que o sistema ajuste o tamanho da caixa de simulação de modo que o virial interno se ajuste a pressão externa aplicada (Eslami, et al., 2008). Este método tem grande vantagem, pois uma única aproximação de tamanho inicial da caixa é necessária, pois o sistema encontrará o tamanho correto por si só, baseando-se no campo de forças. Nos anos 90 Chiu *et al.* (1995) introduziu uma tensão de superfície na simulação,

com a suposição de que a tensão de superfície da membrana é duas vezes a da que corresponde à monocamada lipídica. Esta suposição é questionável já que a tensão da monocamada consiste principalmente da tensão de superfície da interface alcano/ar, mas isto faz uma pequena diferença na simulação: ao invés de acoplamento isotrópico de pressão, um acoplamento anisotrópico, com diferentes componentes de pressão no plano da bicamada e normal ao plano. Quando a interface é perpendicular ao eixo z, a tensão de superfície γ pode ser calculada de:

$$\gamma = -\int [p'(z) - p]dz$$

Onde p'(z) é a pressão lateral, p é a pressão do *bulk* e a integral é definida nos limites da camada. Com duas interfaces perpendiculares ao eixo z, como em nosso caso, a integral pode ser estendida para o infinito, p'(z) = p, pois no *bulk* a tensão de superfície pode ser reduzida á:

$$\gamma = -\frac{1}{2} \left(\frac{p_x + p_y}{2} - p_z \right) L_z$$

Onde definimos a pressão $p_{\alpha} = P_{\alpha\alpha} (\alpha = x, y, z)$ e L_z como o comprimento da caixa na direção z. Estes resultados para uma pressão de -100 bar nas direções x e y em uma caixa de comprimento 5,6 nm (como a utilizada por Chiu em 1995) nos dão $\gamma = 28$ mN/m. Estes valores são a metade dos obtidos por Chiu devido ao fato de no nosso caso termos duas interfaces água/lipídio. Para uma caixa de aproximadamente 6,7nm, a mesma tensão de superfície usada por Chiu nos dá uma pressão de aproximadamente -80 bar nas direções x e y, a qual é a pressão utilizada em todas as simulações que realizamos com membranas DPPC no GROMACS no ensemble N γ T.

Apesar disto, não há diferenças significativas entre os resultados das simulações nos ensembles NpT e NγT. O tamanho do sistema é aproximadamente o mesmo com ou sem tensão de superfície. O ensemble NVT nos mostra muitos elementos preocupantes, apesar de todo o cuidado na escolha das dimensões da caixa. O sistema NVT apresenta um mínimo de densidade muito abaixo do centro da bicamada e uma distribuição diferente atrás da interface comparado com os ensembles NpT e NγT. Também as caudas lipídicas são consideravelmente menos ordenadas do que vemos nos experimentos.

Com isto podemos crer que NVT não é o ensemble apropriado para o estudo de bicamadas em sistemas biológicos, pois sua fluidez torna impossível ou pelo menos mais difícil obter precisão nos resultados dos cálculos em sistemas com dimensões tão grandes. Entretanto é possível obter bons resultados de uma simulação com pressão constante sem ter que assumir a presença de uma superfície de tensão.

A pressão anisotrópica pode nos guiar a um rápido equilíbrio do sistema, mas não há razão para usar algum valor específico para esta finalidade, e pressões muito altas conduziram ao resultado esperado mais rapidamente do que para valores justificáveis fisicamente. O trabalho do Dr. Tieleman conclui que um acoplamento NγT se mostra adequado para as simulações de membranas, entretanto com o avanço dos últimos anos podemos concluir que não existe a necessidade do uso de tais parâmetros, uma vez que a escala de tempo acessível nos dias de hoje é muito maior (Tieleman, et al., 1996).

3.2 – MÉTODOS QUÂNTICOS NO TRATAMENTO DE ÁTOMOS E MOLÉCULAS:

Os métodos que utilizam mecânica clássica apresentam resultados muito bons para a maioria das questões referentes aos sistemas de interesse biológico. Porém, quando Rafael C. Bernardi 59

precisamos entender como uma reação química ocorre, ou como a estrutura eletrônica de uma molécula é afetada na transição entre diferentes meios, como na interface entre água e membrana biológica, a mecância quântica passa a ser necessária.

Diversos métodos de mecânica quântica foram criados para tratar átomos e moléculas, sendo que cada um deles apresenta limitações. Neste trabalho nós utilizamos métodos semi-empíricos e DFT para estudar os fármacos e construir os campos de forças para os mesmos. Também utilizamos o método CPMD, uma aproximação do método DFT para o estudo da dinâmica quântica de moléculas. Este método foi utilizado em conjunto com a dinâmica molecular clássica em estudos de dinâmica híbrida (QM/MM). A seguir seguem descrições dos métodos utilizados.

3.2.1 – MÉTODOS SEMI-EMPÍRICOS:

Devido à dificuldade em aplicar métodos quânticos em moléculas de médio e grande porte, foram desenvolvidos muitos métodos semi-empíricos para tratar tais problemas, sendo que os primeiros métodos só tratavam os elétrons π de moléculas conjugadas. O mais célebre método semi-empírico de tratamento do elétron π é o método do Orbital Molecular de Hückel (HMO), desenvolvido nos anos trinta. Aqui, a Hamiltoniana do elétron π é aproximada para a forma mais simples:

$$\hat{\mathbf{H}}_{\pi} = \sum_{i=1}^{n_{\pi}} \mathbf{H}^{\mathrm{eff}}(i)$$

Rafael C. Bernardi

onde $H^{eff}(i)$ incorpora os efeitos das repulsões do elétron π de uma maneira muito simplificada. Este método é bastante vago, e na realidade o método de Hückel não especifica nenhuma forma explícita para $H^{eff}(i)$.

Embora a teoria de Hückel possa ser usada para predizer as faixas de longo comprimento de onda de hidrocarbonetos aromáticos, seria absurdo tentar usar a teoria HMO para predizer o espectro eletrônico completo de um hidrocarboneto aromático. Por exemplo, a teoria de Hückel negligencia repulsões entre elétrons, não havendo nenhuma separação entre termos de singleto e tripleto que surgem da mesma configuração eletrônica. Experimentalmente são observadas separações de 1.0 eV ou até 2.0 eV entre tais condições, ou seja, a diferença de energia entre os estados singleto e tripleto.

Um método semi-empírico do elétron π que leva em conta a repulsão entre elétrons e que melhora o método de Hückel é o método Pariser-Parr-Pople (PPP), desenvolvido em 1953. Neste método a Hamiltoniana inclui repulsões eletrônicas, e a função de onda do elétron π é escrita como um produto anti-simétrico de orbitais de spin destes elétrons.

Pople e alguns colegas desenvolveram ainda os métodos CNDO (*Complet Neglect of Differential Overlap*), INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*) e NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), com o objetivo de reproduzir os resultados obtidos com métodos *ab-initio* de orbital molecular SCF, com uma teoria que requer muito menos tempo de cálculo no computador. A constante busca de Pople por métodos que fossem mais facilmente aplicáveis e a construção de pacotes computacionais que levaram a popularização destes métodos, deram a ele o Prêmio Nobel de Química de 1998.

Porém os seus métodos usam aproximações grosseiras e podemos esperar que os seus resultados por mais semelhantes que sejam não serão tão precisos e confiáveis como Rafael C. Bernardi 61 os *ab-initio*. Assim estes métodos fazem bem os cálculos de geometria molecular, mas falham no cálculo de cargas e de minimização das energias de ligação. Surgem então vários métodos semi-empíricos semelhantes ao INDO e NDDO, iniciados por Dewar e seus colegas de trabalho, dentre eles o AM1 (*Austin Model 1*) e o PM3 (*Parameterized Model 3*), porém o objetivo de Dewar não era o de reproduzir os valores obtidos com cálculos ab initio SCF, e sim de obter uma teoria que daria as energias que ligam as moléculas com uma precisão química dentro da margem de 1kcal/mol e que pudesse ser usado para moléculas.

O desafio, que a princípio pareceria loucura, era desenvolver uma teoria de orbitais moleculares (MO) que tivesse resultados próximos aos do método ab initio SCF de Hartree-Fock e que ainda tivesse sucesso onde a teoria de Hartree-Fock falha, no desenvolvimento de funções matemáticas para descrever os orbitais. Porém, por escolha própria dos parâmetros no método semi-empírico, a pessoa pode melhorar o resultado obtido com o *ab-initio* SCF, porque a escolha de parâmetros satisfatórios compensaria a negligência de correlação do elétron na teoria SCF.

Estas teorias, do tipo de Dewar, analisam apenas os elétrons de valência, sendo que em sua maioria, estas usam uma base de dados mínima do tipo Slater, de valência *s* e *p* nos orbitais atômicos (com valores para os orbitais determinados por parametrização) com a finalidade de expandir o elétron de valência dos orbitais moleculares. As equações de Fock-Roothaan são resolvidas para achar os orbitais moleculares SCF semi-empíricos. Já nos métodos *ab-initio*, as integrais dos elementos da matriz de Fock são avaliadas com bastante precisão para obter os termos de MO, porém esta não é a aproximação usada na teoria de Dewar. Teorias do tipo Dewar utilizam as integrais de repulsão eletrônica (ERIs) de centro único como parâmetros, cujos valores são escolhidos para ajustar o problema com os dados experimentais, e então são calculadas as integrais de centro duplo, partindo das primeiras, e

Rafael C. Bernardi

assim as distâncias internucleares são calculadas usando aproximações envolvendo parâmetros experimentais e cálculos de minimização de energia. As integrais restantes são avaliadas usando parâmetros aproximados que são projetados para não dar valores que reproduzam os ab-initio com precisão, mas sim que sejam consistentes com aproximações químicas usadas, que nas teorias de Dewar são parametrizadas para render bons valores para entalpia de formação na fase gasosa a 25°C.

Em 1985 Dewar e seus colegas publicaram uma versão melhorada do MNDO chamada AM1 (Austin Model 1, em homenagem a Universidade do Texas em Austin) (Dewar, 1985). O AM1 foi parametrizado para os elementos químicos: H, B, Al, C, Si Ge, Sn, N, P, O, S, F, Cl, Br, I, Zn, e Hg, e a única diferença entre o MNDO e o AM1 está na expressão da energia pontencial para o caroço repulsivo central. Em seguida, em 1989, Stewart reparametrizou o AM1 e criou então o método PM3 (Método Paramétrico 3, onde o 1 seria o MNDO e o 2 o AM1), (Stewart et al, 1991). O PM3 difere também muito pouco do método AM1, as integrais de repulsão eletrônica de centro único são levadas como parâmetros a serem aperfeiçoados (no AM1 estes valores foram obtidos experimentalmente por espectrometria atômica), a função para o caroço repulsivo contém apenas duas gaussianas por átomo (Stewart, 1990). O PM3 foi ajustado para os átomos de H, C, Si, Ge, Sn, Pb, N, P, As, Sb, Bi, O, S, Se, Te, F, Cl, Br, I, Al, Ga, In, Tl, Be, Mg, Zn, Cd, e Hg. Este ajuste para apenas estes átomos deve-se ao fato de a parametrização utilizando resultados experimentais ter sido feita apenas para estes átomos, o que não significa que este método não funcione para outros átomos. Porém para átomos mais pesados (com o número atômico Z aproximadamente maior do que 30) os resultados começam a ficar fora de valores aceitáveis, salvo algumas exceções.

Rafael C. Bernardi

Na última década diversos novos métodos semi-empíricos baseados na teoria de Dewar surgiram. Em sua maioria são apenas reparametrizações do método AM1 e que tem alcaçado bastante sucesso principalmente na predição de geometria molecular. Entre estes métodos um dos que apresenta os melhores resultados é o RM1 (*Recife Model 1*), desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco. Neste trabalho nós utilizamos os métodos semi-empíricos apenas como uma forma de agilizar os cálculos quânticos *ab-initio*, como uma forma de obter a molécula em uma geometria melhor, antes de aplicar métodos mais robustos.

3.2.2 – MÉTODO DO FUNCIONAL DA DENSIDADE:

A Teoria do Funcional Densidade (DFT) é a mais próspera e popular aproximação da mecânica quântica para o estudo de átomos e moléculas. Porém, apesar de ser um método quântico ab-initio, ele não resolve os cálculos através da função de onda e sim através da densidade de probabilidade eletrônica. Entretanto isto é feito tratando esta densidade de probabilidade como se fosse a própria função de onda, aplicando a ela os operadores da mecânica quântica (QM – *quantum mechanics*). Esta teoria é aplicada habitualmente para o cálculo, por exemplo, da energia de ligação de moléculas de interesse na bioquímica ou até mesmo na física do estado sólido. Mas sua abrangência vai desde o campo da biologia e mineralogia, até nos estudos de supercondutividade, efeitos relativísticos em elementos pesados e em núcleos atômicos, estudo de líquidos clássicos ou da propriedade magnéticas de ligas, entre outros.

O desenvolvimento da teoria DFT foi bastante longo, sendo que diversos métodos poderosos, como o de Hohenberg e Kohn, foram desenvolvidos para resolver problemas de

muitos corpos. Na resolução da equação de Schroedinger, anos de estudos foram necessários para um melhor entendimento de como agir na resolução destes problemas. Em física, por exemplo, temos os diagramas da teoria de perturbação (baseados em diagramas de Feynman e funções de Green). Por outro lado, na química freqüentemente usam-se métodos de Interação da Configuração (CI) baseados em expansão sistemática em determinantes de Slater. O problema com estes métodos é a grande exigência de recursos computacionais que seria necessária para trazermos estas equações ao estudo de moléculas e sólidos. É simplesmente impossível aplicá-los eficientemente em sistemas grandes e complexos. Ninguém conseguirá, pelo menos não com a atual capacidade computacional, calcular propriedades químicas de moléculas com mais de 100 átomos com o método CI em sua forma completa, ou a estrutura eletrônica de um semicondutor real usando nada mais que as funções de Green e os diagramas de Feynman.

Este é o ponto onde o DFT tornou-se uma alternativa viável, talvez um pouco menos preciso, mas muito mais versátil. A teoria do funcional da densidade utiliza sistemas coulombinanos não relativísticos que diferem somente por seus potenciais $V(\mathbf{r})$, e ferramentas precisas para lidar com operadores universais de energia cinética e potencial (\hat{T} e \hat{U}). Além disso, a DFT consegue eliminar diversos termos, devido ao seu método de cálculos, trazendo um sistema complexo para o referencial de um único átomo. Isto é feito promovendo a densidade de partículas $n(\mathbf{r})$ ou a densidade eletrônica $\rho_0(\mathbf{r})$ de apenas um entre muitos observáveis como uma variável chave, na qual o cálculo de todos os observáveis pode ser baseado.

Esta aproximação forma a base da grande maioria de cálculos de estrutura eletrônica em física e química. Muito do que nós sabemos sobre as propriedades elétricas, magnéticas

Rafael C. Bernardi

e estruturais de materiais foi calculado usando DFT, e até que ponto a teoria do funcional densidade contribuiu à ciência de moléculas pode ser visto pelo Prêmio Nobel de Química de 1998 que foi dado a Walter Kohn, o pai do método DFT (Kohn, 1999), e John Pople, quem implementou o DFT em química computacional (Pople, 1999).

Para entender melhor a DFT é necessário recordar alguns conceitos elementares de mecânica quântica. Nesta teoria aprendemos que todas as informações que podemos ter de um determinado sistema estão contidas numa função de onda Ψ do sistema. Em sistemas não relativísticos, esta função de onda é calculada da equação de Schroedinger, que para um único elétron movendo-se em um potencial v(**r**) é dada pela seguinte equação:

$$\left[-\frac{\hbar^2 \nabla^2}{2m} + V(r)\right]\psi(r) = \varepsilon \psi(r)$$

Se há mais de um elétron, a equação de Schroedinger para muitos corpos torna-se:

$$\left[\sum_{i}^{N} \left(-\frac{\hbar^2 \nabla^2}{2m} + V(r)\right) + \sum_{i < j} U(r_i, r_j)\right] \psi(r_1, r_2, \dots, r_N) = E\psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$$

onde N é o número de elétrons e $U(r_i,r_j)$ é o potencial de interação elétron-elétron. Como na equação acima, na DFT os graus de liberdade nuclear somente aparecem na forma de um potencial v(r) agindo nos elétrons (aproximação de Born-Oppenheimer), de forma que a função de onda só depende das coordenadas eletrônicas e de sua relação com o núcleo, não explicitanto os termos nucleares. Para um sistema coulombiano temos:

$$\widehat{U} = \sum_{i < j} U(r_i, r_j) = \sum_{i < j} \frac{q^2}{|r_i - r_j|}$$

Rafael C. Bernardi

(note que este último operador demonstra somente a interação do potencial coulombiano). O operador do termo de energia cinética será:

$$\widehat{T} = \frac{\hbar^2}{2m} \sum_i \nabla_i^2$$

Deve-se notar que estas expressões são dadas para um sistema não relativístico. Nosso sistema é um átomo, uma molécula, ou um sólido que depende somente de $v(\mathbf{r}_i)$. Por exemplo, para um átomo, o operador do potencial pode ser dado por:

$$\hat{V} = \sum_{i} V(r_i) = -\sum_{i} \frac{Ze^2}{|r_i - R|}$$

onde Z é o número atômico, *e* é carga do elétron e *R* é a posição do núcleo. Para uma molécula ou um sólido temos:

$$\hat{V} = \sum_{i} V(r_i) = -\sum_{ik} \frac{Z_k e^2}{|r_i - R_k|}$$

onde, a soma em k nos da a soma em todos os átomos do sistema, com carga Z_k e posição R_k . Note que R_k é apenas um arranjo no espaço, com suas correspondentes condições de contorno, que distinguem, fundamentalmente, uma molécula de um sólido.

A manipulação quântica da equação de Schroedinger (SE) pode ser resumida pela seguinte sequência:

$$V(r) \underset{SE}{\Rightarrow} \psi(r_1, r_2, \dots, r_N) \underset{\langle \psi | \dots | \psi \rangle}{\Rightarrow} observations$$

Por exemplo, podemos especificar o sistema escolhendo V(r) e tomando isto na equação de Schroedinger resolvemos esta para uma função de onda Ψ , então calculamos os

valores esperados dos observáveis com esta função de onda. Um entre os observáveis calculados é a densidade de partícula:

$$n(r) = N \int d^3 r_N \psi(r_1, r_2, ..., r_N)^* \, \psi(r_1, r_2, ..., r_N)$$

Este observável é a grande base dos métodos DFT, porém, para resolvermos a equação de Schroedinger, e chegarmos até a expressão para a densidade de partícula, foi traçado um caminho complexo num emaranhado de problemas de cálculo que foram sendo resolvido aos poucos durante o último século.

O primeiro passo no desenvolvimento dos cálculos DFT, para o estudo de sistemas de muitos átomos, surgiu devido ao fato da função de onda eletrônica de uma molécula de n elétrons depender de 3n coordenadas espaciais e n coordenadas de spin. De certo modo, a função de onda de uma molécula de muitos elétrons contém mais informações do que necessitamos. Este foi o estopim para a busca por funções que envolvessem menos variáveis do que a função de onda, possibilitando o uso dos cálculos desenvolvidos para o estudo das energias e outras propriedades atômicas e moleculares.

Em 1964, Hohenberg e Kohn desenvolveram um teorema que segue um caminho um pouco diferente, passando a tratar a densidade eletrônica, e não a densidade de partículas como vinha sendo tratado até então. Este teorema prova que para moléculas com um estado fundamental não degenerado, a energia molecular do estado fundamental, a função de onda, e todas as outra propriedades eletrônicas são exclusivamente determinadas pelo estado fundamental de uma densidade eletrônica de probabilidade $\rho_0(x,y,z)$, uma função que possui apenas três variáveis (Wang, et.al. 1983). É fato que a energia eletrônica do estado fundamental E_0 é um funcional de ρ_0 e pode ser escrita como $E_0 = E_0 [\rho_0]$, onde os colchetes

denotam uma relação funcional. A DFT, partindo do teorema de Hohenberg-Kohn, passa a calcular a energia e outras propriedades moleculares no estado fundamental, a partir da densidade eletrônica do estado fundamental ρ_0 .

Mas o que é um funcional? Sabemos que a função f(x) é uma regra que associa um número, com cada valor da variável *x* para a qual função *f* está definida. Entretanto, um funcional F[f] é uma regra que associa um número com a função *f*. Por exemplo, o funcional $F[f] = \int_{-\infty}^{\infty} f^*(x) f(x) dx$, associa um número, achado pela integração de $|f|^2$ em todo o espaço, com cada função f(x) quadraticamente integrável.

A aproximação feita pela teoria do funcional densidade pode ser resumida da seguinte forma:

$$n(r) \Rightarrow \psi(r_1, r_2, \dots, r_N) \Rightarrow V(r)$$

Por exemplo, o conhecimento de n(r) insinua o conhecimento da função de onda e logo do potencial V(r), e conseqüentemente de todos os outros observáveis. Porém estes conceitos dão uma idéia geral da DFT, mas não especificam como a DFT trabalha exatamente. Para um maior detalhamento do método vide referências: Parr *et al*, 1990; Koch *et al*, 2001; Nalewajski *et al*, 1996; Anisimov *et al*, 1999; March *et al*, 1992, Laird *et al*, 1996; Joulbert *et al*, 1998; Dobson *et al*, 1998; Eschrig, 1996; Gross *et al*, 1995.

A DFT nos dias de hoje:

Nos últimos anos, os cálculos baseados na DFT estão ganhando uma popularidade muito grande, e com isto foram surgindo incontáveis métodos de funcional da densidade. Na verdade, diversos funcionais para aplicarem na DFT, sendo que o por nós utilizado para a análise dos fármacos foi o funcional B3LYP (*Becke-style3 – com correlação funcional de Lee-*Rafael C. Bernardi 69 *Yang–Parr*), utilizando uma base de cálculos gaussiana chamada 6-31G**. Em geral, os funcionais constroem o funcional da densidade, a partir da função de onda, via funções de Green. A aproximação para muitos corpos (no caso de aminoácidos, por exemplo) é feita com o teorema de Hohenberg-Kohn, que é conhecido como o coração dos funcionais da DFT moderna.

O método funcional que utilizamos neste trabalho, o B3LYP, é um método funcional híbrido. Os métodos híbridos definem o funcional de troca como uma combinação linear de aplicações de métodos Hartree-Fock local, e gradientes de correção são empregados para os termos de correlação. Os métodos híbridos mais empregados atualmente utilizam três parâmetros funcionais de Becke, o que é o caso do B3LYP. O funcional híbrido *Beck-style* provou ser muito superior aos funcionais tradicionais, e isto foi comprovado através da comparação com diversos experimentos simples, onde o método B3LYP simulou com precisão os resultados obtidos. Para um estudo mais aprofundado do B3LYP, introduzimos aqui um pouco sobre os métodos híbridos, começando um pouco antes do surgimento destes funcionais, com o estudo da aproximação de densidade local (LDA) e da aproximação da densidade local de spin (LSDA).

Na LDA, Hohenberg e Kohn mostraram que se ρ varia muito lentamente com a posição, então a energia é exatamente determinada por:

$$E_{XC}^{LDA}[\rho] = \int \rho(r) \varepsilon_{XC}(\rho) dr$$

onde a integral é calculada em todo o espaço, com *dr* representando *dx*, *dy* e *dz*, e $\varepsilon_{xc}(\rho)$ é a energia de correlação por elétron em um gás de elétrons homogêneo de densidade ρ .

No LDSA, temos melhores resultados do que os obtidos com o LDA para os estudos de moléculas de camada aberta ou de geometrias moleculares próximas à dissociação. Considerando que no LDA, elétrons com spins opostos emparelhados entre si têm o mesmo orbital espacial KS (orbital de Kohn e Sham), o LSDA pode ser considerado um análogo ao método UHF (Unrestricted Hartree-Fock) (Levine, 2003), que permite diferentes orbitais espaciais de Hartree-Fock para elétrons com spins diferentes. Os teoremas de Hohenberg, Kohn e Sham não requerem o uso de diferentes orbitais para elétrons com spins diferentes, a menos que um campo magnético externo esteja presente. Se o funcional $E_{xc}[\rho]$ fosse exatamente conhecido, não haveria porque resolver o problema desta maneira, porém com um funcional E_{xc} aproximado, como o utilizado nos cálculos KS DFT, é vantajoso permitir que elétrons de diferentes orbitais possam ter spins diferentes, a fim de que haja uma melhora nas propriedades calculadas em moléculas de camada aberta ou com geometrias próximas da dissociação.

O LDA e o LSDA estão baseados no modelo de gás de elétrons uniforme, que é apropriado para um sistema onde ρ varia lentamente com a posição. O integrando na expressão do LDA para E_{xc} é uma função que depende apenas de ρ e na LSDA é uma função de ρ^{α} e ρ^{β} . Funcionais que vão além da precisão do LSDA para corrigir este funcional quanto à variação da densidade de elétrons com a posição foram criados. Estes funcionais fazem isto incluindo os gradientes de ρ^{α} e ρ^{β} no integrando, da seguinte maneira:

$$E_{XC}^{GGA}[\rho^{\alpha},\rho^{\beta}] = \int f\left(\rho^{\alpha}(r),\rho^{\beta}(r),\nabla\rho^{\alpha}(r),\nabla\rho^{\beta}(r)\right)dr$$

onde f é alguma função das densidades de spin e seus gradientes. O índice GGA representa a aproximação de gradiente generalizado. O termo funcional de gradiente de correção é

então empregado para denominar este método. O termo da energia de troca e correlação E_{xc} é normalmente separado em dois termos:

$$E_{XC}^{GGA} = E_X^{GGA} + E_C^{GGA}$$

Onde são desenvolvidas aproximações de trocas de gradientes de correção e correlações funcionais de energias. Para isto são empregadas considerações teóricas, como o conhecido comportamento dos verdadeiros funcionais E_x e E_c em várias situações. Estes funcionais são usados como um guia, em muitos casos com uma dose de empirismo, o que gera algumas críticas com relação à teoria DFT (alguns pesquisadores não aceitam a idéia de que a DFT seja uma teoria *ab-initio*).

Alguns funcionais de troca E_x de gradiente de correção comumente usados são, o funcional de Perdew e Wang de 1986, que não contém nenhum parâmetro empírico, denominados de PW86, também o funcional de Becke de 1988, chamado de B88, Becke 88, ou simplemente B e o funcional de troca PWx91 de Perdew e Wang, desenvolvido em 1991. A forma explicita do funcional de troca B88 é dada pela equação a seguir, onde *b* é um parâmetro empírico que possui um valor igual a 0.0042 unidades atômicas, parâmetro este determinado pelo conhecido ajuste gráfico das energias de troca de Hartree-Fock para diversos átomos.

$$E_X^{B88} = E_X^{LSDA} - b \sum_{\sigma=\alpha,\beta} \int \frac{(\rho)^{4/3} \chi_{\sigma}^2}{1 + 6b \chi_{\sigma} \sinh^{-1} \chi_{\sigma}} dr$$

onde:

$$\chi_{\sigma} \equiv \frac{|\nabla \rho^{\sigma}|}{\left(\rho^{\alpha}\right)^{4/3}}$$

Rafael C. Bernardi

$$\sinh^{-1} x = \ln \left[x + (x^2 + 1)^{1/2} \right]$$
$$E_X^{LSDA} = \frac{3}{4} \left(\frac{6}{\pi}\right)^{1/3} \int \left[(\rho^{\alpha})^{4/3} + (\rho^{\beta})^{4/3} \right] dr$$

É importante salientar que os funcionais PWx86, que não apresentam parâmetros empíricos, e os B88 trabalham igualmente bem, predizendo propriedades moleculares.

Um fator importante é que qualquer funcional de troca pode ser combinado com qualquer correlação funcional. Por exemplo, a notação BLYP/6-31G* denota o calculo feito com o funcional Becke 1988, com as correlações funcionais de Lee-Yang-Parr e com os orbitais de KS se expandindo em uma base de funções gaussianas 6-31G*. Estes funcionais híbridos são, hoje em dia, extensamente usados. Um funcional do tipo híbrido mistura a equação geral para E_x :

$$E_{X} \equiv -\frac{1}{4} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} \left\langle \theta_{i}^{KS}(1) \theta_{j}^{KS}(2) \middle| \frac{1}{r_{12}} \middle| \theta_{j}^{KS}(1) \theta_{i}^{KS}(2) \right\rangle$$

com as equações para os gradientes de correção E_x e E_c . Por exemplo, o popular funcional híbrido B3LYP, onde o número 3 indica três parâmetros funcionais de Becke, é definido por:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a_0 - a_x)E_X^{LSDA} + a_0E_X^{exata} + a_XE_X^{B88} + (1 - a_c)E_X^{VWN} + a_CE_C^{LYP}$$

onde E_x^{exata} é dado pela equação geral para E_x descrita acima, e onde os parâmetros a_0 , a_x e a_c foram escolhidos por ajuste de gráficos criados com dados experimentais de energias moleculares. Um maior detalhamento sobre estes métodos é apresentado no artigo de Becke de 1997 e também no livro de Química Quântica de Levine de 2003.

A escolha da base:

Muitos métodos de mecânica quântica molecular começam o cálculo com a escolha das funções de base χ_r , que serão utilizadas na descrição dos orbitais moleculares (Levine, 2003; Foresman, 1998). Uso de bases adequadas é um requerimento essencial para o sucesso dos cálculos. Os cálculos mais rápidos de integrais moleculares utilizam funções do tipo gaussianas (GTFs) para os orbitais atômicos na função de onda. A função que utilizamos nos cálculos foi a 6-31G^{**}, também conhecida como 6-31G(d,p), que apresenta bons resultados desde o elemento químico Hidrogênio (H) até o Zinco (Zn). Este modelo compreende uma base de funções polarizadas com seis integrais gaussianas em coordenadas cartesianas do orbital d (exceto para o Li e o Ca que são do orbital f, e para o H e He que são do orbital p). Os expoentes dos orbitais nestas polarizações são funções otimizadas a partir de valores calculados para pequenas moléculas com propriedades muito conhecidas, como a água, por exemplo.

3.2.3 – CAR-PARRINELLO MOLECULAR DYNAMICS (CPMD):

A dinâmica molecular de Carr-Parrinello é um método de dinâmica molecular quântica *ab-initio* que usa pseudopotenciais e fuções de base que são ondas planas. Baseado no método DFT, este método foi proposto por Roberto Car e Michele Parrinello em 1985 e tem sido muito utilizado para o cálculo de propriedades químicas de materiais e de sistemas biológicos. A teoria proposta por Car e Parrinello introduz explicitamente os graus de liberdade eletrônicos como variáveis dinâmicas na Lagrangeana que descreve o sistema:

$$\mathcal{L} = \frac{1}{2} \left(\sum_{I}^{n \text{ ucleo}} M_{I} \dot{\boldsymbol{R}}_{I}^{2} + \mu \sum_{i}^{orbitais} \int d\boldsymbol{r} |\dot{\psi}_{i}(\boldsymbol{r}, t)|^{2} \right) - E[\{\psi_{i}\}, \{\boldsymbol{R}_{I}\}]$$

Rafael C. Bernardi

onde a função de onda ψ obedece a condição de ortogonalidade:

$$\int d\boldsymbol{r}\,\psi_i^*(\boldsymbol{r},t)\psi_j(\boldsymbol{r},t)=\delta_{ij}$$

Isto leva a uma equação de movimento que descreve tanto os íons (núcleos) como os elétrons. Este modelo é diferente do modelo da dinâmica molecular de Born-Oppenheimer, onde os graus de liberdade dos núcleos são propagados usando forças iônicas que são calculadas em cada interação através da solução do problema eletrônico com métodos convencionais de diagonalização da matriz densidade.

A principal diferença entre estes métodos durante o cálculo é que a minimização explicita da função que descreve a camada eletrônica que é feita a cada passo na MD de Born-Oppenheimer não é necessária na CPMD. Neste método, após uma minimização inicial da fução dos elétrons, uma dinâmica fictícia dos elétrons os mantém em seu estado fundamental correspondente a cada nova configuração dos núcleos durante a dinâmica, garantindo um acurado valor para as forças iônicas.

3.2.4 – MÉTODOS HÍBRIDOS DE DINÂMICA MOLECULAR (QM/MM):

Os métodos de dinâmica puramente quântica, como o método CPMD ou o B3LYP são muito poderosos, porém muito caros computacionalmente. Por outro lado os métodos de mecânica molecular (métodos clássicos) são bastante rápidos, entretanto apresentam uma série de limitações, como descritas anteriormente neste trabalho. Para tentar resolver este problema foram criados os métodos híbridos de mecânica quântica (QM) e mecânica clássica (MM). A QM resolve a parte onde precisamos de maiores detalhes e a parte clássica ficaria responsável pelo restante do sistema. A maior vantagem dos métodos híbridos seria a Rafael C. Bernardi 75 sua velocidade aliada a uma boa qualidade, além é claro de ampliar a gama de estudos possíveis, por exemplo, permitindo o estudo de reações químicas.

A combinação que utilizamos neste trabalho envolve o software GROMACS, utilizado para dinâmica molecular clássica, e o CPMD, software desenvolvido para dinâmica molecular quântica no qual podemos utilizar o método de Car-Parrinello ou de Born-Oppenheimer. Nesta combinação, o GROMACS controla todo o processo da dinâmica, apenas utilizando o CPMD para calcular a energia potencial da região a ser tratada com método quântico. Com esta energia o GROMACS calcula a nova posição de todos os átomos do sistema e os desloca para então seguir a um novo passo onde irá calcular novamente as energias.

3.3 – PROTOCOLOS E PARÂMETROS PARA OS CÁLCULOS DE DINÂMICA MOLECULAR:

Devido à enorme quantidade de cálculos de modelagem e dinâmica molecular que foram necessários para a realização deste trabalho, não apresentaremos os arquivos com toda a lista de parâmetros utilizados para todos os cálculos. Os parâmetros principais, bem como as principais alterações, são discutidos no decorrer da apresentação dos resultados no próximo capítulo. Um exemplo de arquivo de parâmetros do GROMACS e um do NAMD são apresentados em anexo no final deste trabalho (Anexo 7.13).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Neste trabalho abordamos diversas formas de estudar o efeito anestésico através de métodos computacionais de modelagem molecular. Nos próximos capítulos discutiremos estes cálculos de forma separada a fim de facilitar a compreensão de cada uma das abordagens.

4.1 – PARAMETRIZAÇÃO DOS CAMPOS DE FORÇAS E ESTUDOS COM ANESTÉSICOS LOCAIS EM SOLVENTE AQUOSO:

Cada vez mais freqüentes na literatura, estudos de fármacos em interação com sistemas aquosos ou interfaces biológicas têm sido aplicados nas mais vastas áreas, desde o estudo de possíveis tratamentos para as mais diversas patologias, até mesmo na criação de armas químicas. A interação entre anestésicos locais (LA – do inglês: *Local Anesthetics*) e sistemas-modelo de membrana é uma destas áreas de interesse. Aplicações destes modelos podem ser feitas em estudos de toxicologia, na criação de novos fármacos e até mesmo em testes de comportamento do fármaco em escala atômico-molecular. Neste capítulo, propomos um estudo da interação de LA com diferentes meios, tendo como objetivo compreender o comportamento destas pequenas moléculas próximas da membrana celular. Para tal faremos analises de três anestésicos: Procaína (PRC), Tetracaína (TTC) e Lidocaína (LDC), escolhidos devido a algumas peculiaridades de cada um que serão discutidas adiante. Este trabalho foi dividido em duas partes que foram publicadas no *International Journal of Quantum Chemistry* em 2006 e 2007 (anexo 7.1 e 7.2).

Os LAs bloqueiam reversivelmente a condução do impulso nervoso, entre eles, aqueles envolvidos com estímulos nociceptivos. Esta atuação paralisa as terminações nervosas sensitivas periféricas, ou ainda a transmissão da sensibilidade à dor entre Rafael C. Bernardi 77 terminações (nociceptores) e o encéfalo. Para tal, estes pequenos fármacos (Figura 20) apresentam-se geralmente em duas formas: uma neutra e outra catiônica. A forma catiônica da molécula é devida à inserção de um Hidrogênio no grupo amino. Isto ocorre devido ao fato do pKa dos LAs geralmente variar entorno de 7,5 e 9,0. Logo, em meio fisiológico, onde o pH é aproximadamente neutro, teremos tanto moléculas neutras como carregadas, estando estas últimas geralmente em maior proporção.

Tetracaína



Procaína



Lidocaína



Figura 20: Fórmula química dos anestésicos locais: Tetracaína (TTC), Procaína (PRC) e Lidocaína (LDC).

Para complementar a análise experimental e os dados de simulação disponíveis na literatura, executamos simulações computacionais para caracterizar a interação desses fármacos com biomembranas. Para tal, o estudo começou com a obtenção de dados estruturais das moléculas de LA, como carga líquida de cada átomo e geometria das moléculas de TTC, PRC e LDC, de modo a podermos parametrizar os campos de forças clássicos para estes fármacos. Estes campos de forças já estão contidos em softwares de Dinâmica Molecular (MD – *Molecular Dynamics*), como o GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulations*) (Lindahl, et al., 2001), que utilizamos neste trabalho.

Os dados de geometria e carga da molécula foram calculados utilizando três métodos de forma consecutiva, para aliviar o tempo de cálculo dos computadores. O primeiro método utilizado, e menos preciso foi o método clássico de mecânica molecular (MM – *molecular mechanics*), que nos dá valores de geometria que são usados como dados de entrada num cálculo mais complexo que foi realizado em seguida: o semi-empírico PM3 (*Parameterized Model 3*). O cálculo da geometria através deste método já nos apresenta valores próximos aos experimentais para pequenas moléculas orgânicas como a nossa. Porém, como precisamos de valores mais confiáveis, utilizamos a geometria fornecida pelo método PM3 como entrada para o cálculo B3LYP (*Becke 3 – parameter: Lee – Yang – Parr*), com a base 6-31G** (Becke, 1993; Becke, 1988).

O método quântico B3LYP é baseado na teoria do funcional da densidade DFT (Density Functional Theory), uma das mais poderosas ferramentas de cálculo de propriedades atômicas e moleculares. Os resultados obtidos com estes cálculos nos fornecem valores razoáveis para a geometria da molécula e para a carga de cada átomo, além é claro de muitas outras propriedades físico-químicas que se queiram calcular. Então,

Rafael C. Bernardi

com os valores de carga atômica e geometria, parametrizamos o campo de forças GROMOS, possibilitando as análises da dinâmica clássica destas moléculas.

O estudo de dinâmica molecular aplicado a fármacos é um problema que deve ser tratado de forma diferente da maioria dos demais estudos de MD. Ao trabalharmos com estas moléculas temos que tomar cuidado com o fato de que fármacos geralmente apresentarem algumas peculiaridades, como grande flexibilidade estrutural, superfícies eletrostáticas com alta polaridade ou mesmo com polaridade que varia muito de acordo com o meio, que podem incluir grupos aromáticos. Outro problema é que softwares livres para MD, como o GROMACS ou NAMD, são parametrizados para o estudo de macromoléculas biológicas, como proteínas e DNA, não trazendo em seu banco de dados os parâmetros necessários para descrever estruturas diversificadas como fármacos.

Com este problema inicial, ao invés de nos dedicarmos à análise direta da MD, tivemos de estabelecer e aplicar protocolos para obtenção de parâmetros para o campo de forças as nossas necessidades. O que devíamos obter, para uma análise razoável, seriam pelo menos os valores das cargas de cada um dos átomos, além da geometria da molécula com o máximo de precisão. Isto já bastaria para a parametrização de um campo de forças do tipo do GROMOS que utilizamos em nossos estudos iniciais. O ideal seria ainda calcularmos os potenciais harmônicos de vibração da molécula, ou seja, as constantes de Hooke para a interação entre cada um dos átomos, em todos os possíveis movimentos vibracionais da molécula. Mas um cálculo preciso destes exigiria um tempo de cálculo proibitivo para a nossa realidade. Então, entre baixar a precisão do cálculo dos potenciais harmônicos de vibração, o que ainda levaria muito tempo, e utilizar os valores já parametrizados do GROMACS para aminoácidos, optamos pela segunda opção, já que a estrutura de alguns aminoácidos apresenta grupos semelhantes ao de um LA.

Rafael C. Bernardi

Como discutimos, obter estes parâmetros envolve uma seqüência de cálculos um tanto exaustiva. Métodos complexos como o DFT, se aplicados a moléculas com uma geometria muito distante da ideal, podem levar a tempos de cálculo proibitivos. O que se faz então é tentar obter parâmetros mais adequados para usar como início nos cálculos DFT, usando, por exemplo, métodos semi-empíricos ou mesmo minimizações com potenciais clássicos. Para os LAs, partimos da suas fórmulas químicas e utilizando um software que nos permitia a construção de uma estrutura tridimensional, obtivemos uma primeira aproximação da geometria de cada um destes fármacos (Figura 21). O mesmo software faz a minimização da energia potencial das moléculas através de diversos métodos. Então, utilizando o método clássico MM fizemos uma otimização para a geometria dos LAs.

O Ghemical, utilizado para esta primeira parte dos cálculos, nos fornece um arquivo de saída com aproximações para a geometria dos fármacos em coordenadas cartesianas e a partir destas podemos construir inputs para softwares que realizam operações mais complexas. A partir destes dados, calculamos novamente a geometria dos LAs utilizando para isto o pacote Gaussian 2003, que consiste em uma das mais poderosas ferramentas de cálculo quântico. Este software, além de apresentar bastante credibilidade em seus resultados, é de fácil operação e apresenta saídas de dados bastante detalhadas e por isso foi por nós escolhido como a melhor opção para o problema que estávamos tratando.

Após a otimização de geometria pelo método semi-empírico PM3 com o programa Gaussian 2003, otimizamos a estrutura com o funcional B3LYP e a base 6-31G**. Notamos que o B3LYP convergiu de forma direta para o mínimo, isto ocorre principalmente devido às minimizações que prévias.

Rafael C. Bernardi



Figura 21: Captura da tela do software livre Ghemical, utilizado para construir o input dos anestésicos locais e também para realizar os cálculos utilizando a teoria de modelagem molecular clássica. Na imagem vemos a tetracaína em sua forma neutra.

Analisando os valores das cargas calculados no cálculo DFT com o método chelpG (Breneman, et al., 1990), vemos que ocorreram apenas pequenas mudanças quando há protonação dos LAs (Tabela 1). A única alteração relevante ocorre na variação da carga do átomo de nitrogênio do grupo amina, que é alterada de aproximadamente -0.5e na forma neutra para um valor levemente positivo na molécula protonada. No restante da molécula as cargas são redistriuídas pelos átomos, porém com pequenas variações, para resultar na carga total zero ou um, conforme o caso. Uma variação um pouco maior na carga também pode ser notada nos carbonos que são primeiros vizinhos do átomo de nitrogênio da amina. Uma análise importante a ser feita é quanto aos deslocamentos das cargas atômicas. Outro grande deslocamento de cargas que vemos está no nitrogênio do centro lipofílico, que tem uma grande carga negativa em todos os LA, tanto carregados como neutros. O deslocamento de cargas através do anel aromático da TTC é observado neste caso, a forte polarização observada na carbonila provavelmente expulsa elétrons para o nitrogênio do outro lado do anel aromático. Na lidocaína a carga parcial obtida pelo átomo de nitrogênio já não é tão expressiva.

Rafael C. Bernardi

Tabela 1: Cargas parciais obtidas pelo método chelpG. Os valores das cargas dos grupos CH_n foram agrupados sobre o Carbono. A nomenclatura dos átomos é a mesma da Figura 20.

Lidocaína			Procaína			Tetracaína		
Átomo	Neutro	Carregado	Átomo	Neutro	Carregado	Átomo	Neutro	Carregado
C01	-0.05369	-0.01633	C01	0.61308	0.62726	C01	0.70798	0.65843
H02	0.09310	0.10836	C02	-0.12325	-0.18465	C02	-0.20597	-0.20534
C03	-0.19779	-0.20442	C03	-0.03140	0.01172	C03	0.02076	0.01830
H04	0.11432	0.13431	H04	0.08729	0.10250	H04	0.08706	0.09935
C05	-0.24713	-0.22260	C05	-0.02817	-0.00240	C05	0.01118	-0.02105
H06	0.12660	0.13561	H06	0.08954	0.10098	H06	0.07277	0.08243
C07	0.09496	0.10246	C07	-0.26354	-0.32003	C07	-0.32759	-0.31150
C08	0.01305	0.03003	H08	0.13121	0.14862	H08	0.13001	0.14134
C09	0.11980	0.14153	C09	-0.27351	-0.31234	C09	-0.27783	-0.25057
C10	-0.00671	-0.00295	H10	0.13052	0.14785	H10	0.11608	0.11994
C11	0.08880	0.03614	C11	0.41852	0.60134	C11	0.46540	0.45804
N12	-0.52452	-0.44375	N12	-0.80944	-0.96888	N12	-0.68330	-0.62812
C13	0.27920	0.32197	H13	0.34805	0.43570	H13	0.32500	0.32542
C14	0.63810	0.61246	H14	0.34948	0.43487	014	-0.53851	-0.52671
015	-0.49268	-0.49500	015	-0.48758	-0.54590	015	-0.47951	-0.42920
C16	0.07473	-0.04148	O16	-0.43826	-0.38714	C16	0.30522	0.31663
N17	-0.55193	0.11573	C17	0.27982	0.31092	C17	0.20775	0.13781
C18	0.31021	0.21290	C18	0.19912	0.07557	N18	-0.46019	0.03401
C19	0.24307	0.33390	N19	-0.58265	0.01993	C19	0.12843	0.19885
C20	-0.07431	-0.00114	C20	0.26993	0.14408	C20	0.12843	0.20681
C21	-0.04718	0.02100	C21	0.25549	0.18299	C21	0.25615	0.25163
H22		0.12127	C22	-0.05620	0.04460	C22	-0.01882	0.00228
		-	C23	-0.07805	0.03387	C23	0.06705	0.05802
			H24		0.29854	C24	-0.03748	-0.01955
						H25		0.28275

A análise da geometria nos leva primeiramente a um estudo de um princípio básico, o anel aromático junto com seus átomos de hidrogênio e primeiros vizinhos deve ser plano, e isto pode ser verificado em todos os LAs calculados. Outra análise importante é quanto ao diedro do tipo piramidal formado no nitrogênio do centro hidrofílico, este diedro deve ter um ângulo de aproximadamente 35°, seguindo o padrão adotado para este tipo de estrutura, sendo que o valor obtido no cálculo da estrutura da TTC protonada, por exemplo, foi de 33.193°. Esta propriedade, de ângulos diedrais, é uma das poucas diferenças notáveis na geometria entre o método semi-empírico e o DFT. No semi-empírico, a planaridade dos anéis força a estrutura tridimensional do grupo amina de maneira bastante irregular.

Algumas distâncias de ligações químicas também diferem de uma molécula para a outra, principalmente na região do átomo de hidrogênio que ioniza os LAs. As ligações entre os átomos de carbono e o de nitrogênio da amina são maiores na molécula protonada em relação à molécula neutra. Todas estas transformações da geometria são devido às transferências de cargas, que ocorrem quando protonamos a molécula. O deslocamento das cargas provoca algumas ressonâncias nas ligações atômicas, provocando um distúrbio em sua configuração geométrica neutra.

Cálculos de Dinâmica Molecular:

Iniciando os cálculos de MD construímos a topologia dos LA, que consiste na construção de um arquivo onde escrevemos todas as ligações diretas entre átomos vizinhos, todos os ângulos entre três átomos, a carga de cada átomo, os possíveis diedros próprios e impróprios, colocando para cada um sua devida constante. Também é necessário escolher os parâmetros de van der Waals a serem utilizados, porém uma extensa biblioteca de valores já está disponível na maioria dos campos de forças.

Com a topologia escrita, criamos uma caixa d'água cúbica, em condições periódicas de contorno, utilizando o modelo padrão já existente nas bibliotecas do GROMACS. No centro da caixa foi fixada uma molécula de LA, cercada de aproximadamente 3000 moléculas de água que seguiam o modelo SPC, como na Figura 22. Foram empregados os raios de corte de 14.0 nm para o tratamento eletrostático e de Lennard-Jones. Realizando então uma dinâmica curta de teste, à temperatura de 300k, reparamos que a geometria média na dinâmica se manteve aproximadamente estável, não diferindo significantemente do modelo montado na entrada com a topologia.



Figura 22: Ilustração do anestésico local benzocaína em uma caixa d'água usada nas simulações por dinâmica molecular.

Realizando então a dinâmica na água por um tempo de 5.0 ns, obtivemos dados para uma análise da função de distribuição radial (RDF), também conhecida como função g(r), dos LAs em relação às moléculas de água, para verificar as capas de hidratação dos diferente sgrupos químicos dos anestésicos. Inicialmente construímos as RDF para cada uma dos átomos de cada uma das três moléculas de LA em relação às moléculas de água, porém vimos que apenas algumas das regiões dos anestésicos eram para nós de real interesse. Para definirmos o que era ou não de nosso interesse, tomamos por base principalmente as diferenças entre a forma protonada e neutra.

Ao analisarmos a g(r) para o átomo de hidrogênio que protona a amina (Figura 20), vemos que é nítida a presença de capas de hidratação ao seu redor Figura 23. Nota-se que os anestésicos do grupo amino-éster (PRC e TTC) apresentam uma função de distribuição similar com um primeiro pico a uma distância de aproximadamente 0.19 nm, sugerindo então a formação de ligações de hidrogênio entre estes átomos de hidrogênio e de oxigênio das Rafael C. Bernardi 85 moléculas de água. Na TTC também notamos que a segunda e a terceira camada de hidratação estão localizadas um pouco mais próximas do que nos demais LAs o que pode representar uma região mais atrativa, provavelmente porque a TTC é uma dimetilamina enquanto os demais LAs estudados são dietilaminas.



Figura 23: Gráfico da RDF do átomo de hidrogênio que protona os LAs (TTC em preto, PRC em vermelho e LDC em verde) em relação a átomos de oxigênio da água. Em primeiro plano uma visão ampliada da região da primeira capa de hidratação e no detalhe uma visão geral da função g(r).

Para a LDC, uma amino-amida, o primeiro pico representa uma capa muito menos intensa e localizada a uma distância maior do que nos demais LAs, demonstrando então um leve caráter hidrofóbico nesta região. Nesta molécula, a curta distância entre o grupamento amina e o oxigênio da carboxila, provavelmente acaba deixando o átomo de hidrogênio pouco carregado, reduzindo então a sua atração ao átomo de oxigênio da água.



Figura 24: Gráfico da RDF do átomo de oxigênio da carbonila em relação aos de hidrogênio das moléculas d'água. Em vermelho temos as moléculas protonadas e em preto as neutras.

A RDF para o oxigênio da carboxila (átomo 14 para TTC, 15 para PRC e LDC de acordo com a Figura 20) é dependente do estado de carga destes LAs. Na forma neutra os amino-ésters apresentam um caráter hidrofílico o que é visto por um pico muito forte entorno de 0.175 nm (Figura 24). O primeiro pico para a LDC (amino-amida) está localizado a aproximadamente à mesma distância, porém com uma intensidade significativamente menor que o valor observado nos demais anestésicos. Isto também deve estar relacionado à proximidade entre esta porção da molécula e o terminal amina, além de que na LDC existe um nitrogênio entre a carbonila e o anel aromático, o que pode provocar um pequeno deslocamento de cargas na região, reduzindo a atração entre o átomo de oxigênio do LA e as moléculas de água.

Ao protonarmos os LAs, vemos que a TTC e a LDC tornam-se mais hidrofílicas, porém na PRC o efeito é contrário, e a molécula torna-se um pouco menos hidrofílica. Isto deve ocorrer, pois aparentemente uma ponte de hidrogênio intramolecular pode surgir aqui, fazendo com que o átomo de oxigênio fique parte do tempo "ligado" ao de hidrogênio que ioniza o terminal amina. Entretanto, isto é uma especulação uma vez que este é o tipo de reação que somente podemos simular em um cálculo que considere os elétrons independentes, como um cálculo quântico.

Estes resultados demonstram um caráter não homogêneo dos anestésicos locais com relação à afinidade à água. Cada um dos anestésicos tende a se comportar de uma maneira um pouco diferente. Estas análises são muito relevantes para o estudo de anestésicos locais em membranas lipídicas uma vez que as regiões hidrofóbicas são lipofílicas e assim toda esta porção dos LAs tende a penetrar na membrana.

Podemos supor a partir destas simulações que devido à aparente afinidade pela água do átomo de hidrogênio que ioniza a amina e aos próprios terminais CH₃, que a forma protonada da TTC deve ser a que terá maior dificuldade para permear a membrana, seguida pela PRC e pela LDC. Sabemos também, a partir de resultados experimentais, que a LDC tem um efeito mais fraco e mais rápido, seguida pela PRC e pela TTC, que é a com maior poder anestésico entre os LAs aqui estudados. Aparentemente a forma neutra destas moléculas é capaz de penetrar a membrana, e como é muito hidrofóbica a LDC deve ser também bastante lipossolúvel o que poderia atribuir-lhe um efeito mais curto do que as demais. Porém ainda é cedo para especular algo mais do que isso. Alguns detalhes a mais são apresentados em anexo nos artigos que publicamos que se referem ao estudo de anestésicos locais em solvente aquoso.

Rafael C. Bernardi

4.2 – INTERAÇÃO ENTRE ANESTÉSICOS LOCAIS E MEMBRANAS BIOLÓGICAS:

Estudar os anestésicos locais em uma caixa com água ajuda muito na análise do problema em questão, porém não podemos esperar resultados conclusivos por estes sistemas, uma vez que a ação anestésica envolve a participação direta ou indireta de biomembranas. Sendo assim, seguimos a uma etapa mais complexa, passando da simulação de uma molécula em um solvente explicito homogêneo para a dinâmica da mesma em um sistema heterogêneo envolvendo água e lipídeos de dipalmitoil-fosfatidil-colina (DPPC), como o sistema da Figura 25.

Alguns experimentos nos permitem compreender um pouco melhor as propriedades macroscópicas dos LAs, porém o conhecimento de como se dá a interação das moléculas anestésicas com membranas fosfolipídicas é algo ainda não compreendido. Este é um problema que não pode ser totalmente resolvido experimentalmente, pelo menos não com as técnicas conhecidas hoje (Fraceto, et al., 2006).

Criar o modelo para a membrana é uma tarefa muito complexa, uma vez que são diversas propriedades observáveis que devem ser ajustadas. No nosso trabalho utilizamos uma membrana já construída pelo grupo do prof. Dr. Peter Tielleman da Universidade de Calgary, Canadá. O modelo já estava razoavelmente estável e com a membrana bem solvatada em água, deixando basicamente o problema da interação anestésico-membrana a ser resolvido.

Nossos resultados apresentados no capítulo anterior indicam a possibilidade de formação de ligações hidrogênio intramoleculares nos LAs, o que observamos para a procaína (Figura 26). Este seria um efeito de polarização interna dependente da conformação da molécula devido à vizinhança entre o grupo aromático e o ionizável (que é

polar), conforme comentado anteriormente. Para explorar esse efeito e verificar a importância dessa ligação hidrogênio para a estabilidade conformacional do fármaco e possível implicação para a interação com membranas e para o efeito anestésico, teríamos de empregar Dinâmica Molecular Quântica ou um campo de forças polarizável, o que não ainda era inacessível nessa fase inicial do projeto.



Figura 25: Captura de imagem da dinâmica molecular da LDC protonada na membrana de DPPC. Imagem feita com o software VMD (www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/) do início do cálculo feito com GROMACS.

Optamos por avançar abordando outro problema, envolvendo outro anestésico local de interesse, a benzocaína (BZC). Este LA é o único desta classe de fármacos que em meio fisiológico se apresenta apenas na forma neutra, o que coloca em questionamento a importância da presença do grupo ionizável na molécula para o efeito anestésico. Construímos o campo de forças para a BZC da mesma forma como descrita para os demais anestésicos no capítulo anterior. Os valores das cargas parciais deste fármaco estão apresentados na Figura 27 e os testes iniciais indicaram que a polaridade deste fármaco induz uma anfifilicidade que não é vista nos demais anestésicos locais.


Figura 26: Procaína em sua forma neutra (acima) e carregada (abaixo) mostrando a distância entre o nitrogênio do terminal amina e o oxigênio da carbonila. Note que na forma protonada a distância equivale a uma ligação de hidrogênio intramolecular. Esta ligação afeta a distribuição de cargas do fármaco, como mostrado na Tabela 1.



Figura 27: Anestésicos locais utilizados nos cálculos de interação com a membrana de DPPC. As cargas parciais da BZC são apresentadas aqui uma vez que não estavam contidas na Tabela 1. Os átomos destacados com triângulos em vermelho e preto são os átomos de referência que utilizaremos nas análises futuras em biomembranas.

Com a topologia construída e devidamente testada, colocamos os LAs em uma cavidade na água em uma região próxima à bicamada de DPPC, constituída de 32 lipídeos em cada lado. Foram empregadas cerca de 3800 moléculas de água, em um banho térmico de Nosé-Hoover (320 K) e com acoplamento de pressão de Parrinello-Rahman. O tratamento eletrostático foi feito com o método PME, com raio de corte de 0.9 nm, enquanto as interações de van der Waals foram computadas até um raio de corte de 1.0 nm. Assim fizemos um cálculo inicial de 2ns apenas para relaxar o sistema e poder desprezar possíveis tensões iniciais na dinâmica (Figura 25). Em seguida foram feitos 50 ns de dinâmica do sistema membrana-água-anestésico. Uma dinâmica como esta leva alguns dias, cerca de três semanas em nosso caso, com os recursos computacionais acessíveis na época da realização desta fase do projeto, para cada um dos seis sistemas simulados. Os principais resultados foram publicados no *Molecular Physics* em 2009, trabalho que segue em anexo.

Nossos resultados indicaram que a forma carregada dos anestésicos ionizáveis ficam retidas na interface membrana-água e a neutra se insere no interior da membrana, conforme inferido pelos resultados de solvatação de ambas as formas no capítulo anterior. Observa-se na Figura 28 (tomada no final de 50ns de dinâmica) que a forma protonada dos fármacos fica na região próxima a superfície da membrana, tendo durante a dinâmica penetrado a bicamada apenas com seu domínio lipofílico e nenhuma vez com a região do grupo amina.

Com relação à forma neutra, observamos que na primeira vez que a molécula se aproximou bastante da membrana, se orientou de forma a ter seu lado lipofílico entrando primeiro e se inseriu completamente na membrana em seguida (Figura 28). Utilizando simulações por dinâmica molecular nós observamos que tanto a forma neutra como a carregada dos LAs se aproximam muito rapidamente da membrana. A forma carregada atinge a membrana mais rapidamente, isto ocorre principalmente devido as interações

eletrostáticas que são de longo alcance, com as cabeças lipídicas. Para melhor compreender a interação dos LAs com a membrana, utilizamos dois átomos de referência em cada um dos LAs estudados, como mostra a Figura 27. Seguimos então a posição no eixo z (Figura 29) destes átomos de referência, que indicam a posição do anestésico na membrana. Os gráficos da Figura 30 mostram que as formas carregadas rapidamente se aproximam da membrana e ficam presas na interface pelo terminal amina. A forma neutra da lidocaína e da tetracaína ao se aproximarem da membrana ultrapassam a região da cabeça polar sem maiores dificuldades.



Figura 28: Posição dos Anestésicos Locais após a MD de 50 ns. O sufixo "u" e "c" utilizados aqui indicam respectivamente a forma neutra e a forma carregada. Extraído de (Bernardi, et al., 2009).

Observamos que as formas neutras se aproximam da membrana orientadas por sua região lipofílica e então se inserem completamente. No início a forma neutra assume uma posição parecida com a dos lipídios, alinhadas a eles e em seguida entram completamente na membrana, ficando livre no interior da região das caudas lipídicas.



Figura 29: Bicamada Lipídica com indicação do eixo z, perpendicular ao plano da interface.

Como já discutido, nossas primeiras simulações de dinâmica molecular somente em solução aquosa indicaram que os anestésicos carregados ficariam presos na superfície da membrana devido a sua alta anfifilicidade. Nossos resultados apresentados no gráfico da Figura 30 mostram que a molécula carregada se aproxima da membrana em menos de 10ns, concordando com o que nossos estudos de anfifilicidade indicam.

A Figura 30 também indica que apesar da BZC ser o único LA que é encontrado apenas na forma neutra, este se comporta como a LDC e a TTC carregada, estabilizando na interface membrana-água. A BZC então se aproxima da membrana e se estabiliza orientada na membrana como um dos lipídios. A Figura 28 ilustra as informações contidas no gráfico Rafael C. Bernardi 94 da Figura 30, nela vemos a posição que os anestésicos se estabilizam na região da interface. Observa-se que a BZC e as formas carregadas da TTC e da LDC se alinham com os lipídios de DPPC.



Figura 30: Gráfico representando a posição dos átomos de referência apresentados na Figura 27. O controle é uma membrana sem a presença de anestésicos onde plotamos a posição média dos átomos de fósforo do lipídio. Nos demais gráficos a linha tracejada em azul indica a região onde estão os átomos de fósforo. Extraído de (Bernardi, et al., 2009).

O alinhamento destes anestésicos com a membrana, mantendo a região N-terminal interagindo com as cabeças das DPPC, remove graus de liberdade rotacionais e translacionais destes fármacos e alguma flexibilidade interna. Esta restrição no movimento dos LAs aumenta as chances de interação destas moléculas com possíveis sítios de ligação Rafael C. Bernardi 95 na região de interface de proteínas transmembranares, como os canais iônicos, apontando para um papel catalisador da membrana para essa interação. Estas simulações indicam que os anestésicos locais em sua forma carregada podem ter um papel fundamental no efeito anestésico. Para assegurar que estes resultados estavam se mantendo por um tempo maior de simulação, rodamos a dinâmica da TTC em seus dois estados de protonação por 100ns. A Figura 31 mostra que durante estes 50ns extras não há alteração na estabilidade do fármaco na membrana em relação ao final dos 50ns iniciais.



Figura 31: Gráfico representando a posição dos átomos de referência da tetracaína apresentados na Figura 27. Acima vemos a forma protonada da TTC e abaixo a forma neutra. A linha tracejada em azul indica a região onde estão os átomos de fósforo. Extraído de (Bernardi, et al., 2009).

Nossos resultados não permitem uma análise se supostos rompimentos ou maiores perturbações da membrana provocados pelos anestésicos, uma vez que simulamos apenas um anestésico local por vez na caixa de simulação. Nosso principal objetivo foi estudar como Rafael C. Bernardi 96 os anestésicos locais se relacionam com a membrana e comparar isto com os resultados obtidos no estudo com os fármacos em uma caixa com água. Uma das principais razões para simularmos apenas um fármaco por vez foi a evidencia experimental de que os anestésicos podem interagir um com os outros, o que poderia nos levar a uma análise que não fosse estatisticamente (Kitagawa, et al., 2004). O estudo de altas concentrações de anestésico local em uma caixa com água tem sido alvo de um trabalho conjunto com nossos colaboradores da Universidade Estadual de Londrina, trabalho este que foi aceito para publicação na *Química Nova* após algumas pequenas correções e segue em anexo (capítulo 7.5).

Um estudo do efeito de altas concentrações de fármaco na bicamada deveria ser feito com membranas maiores, onde poderíamos avaliar as perturbações sofridas pela mesma além de avaliar o efeito da pressão exercida lateralmente com a penetração dos anestésicos. Devido a nossa baixa concentração, efeitos como aumento da área por lipídio durante a simulação não foram observados sendo que a área da DPPC permanece aproximadamente constante em 0.59 nm² durante toda a simulação, como sugeria o modelo proposto por Tieleman.

Em outra análise nós contamos o número médio de pontes de hidrogênio da TTC com lipídeos da DPPC ao longo da dinâmica. Esta análise indica que a forma neutra tem uma média de 0.019 ligações de hidrogênio para cada paço de cálculo da dinâmica, enquanto a forma carregada tem uma média de 1.219 ligações para cada passo, sendo que todas estas ligações ocorrem na região do grupo amina. Estes resultados nos ajudam a mostrar que a região amino-terminal segura a forma carregada dos fármacos na interface.

Analisando a função de distribuição radial das moléculas de TTC em relação aos lipídios, vimos que o átomo de fósforo da DPPC se mantém próximo ao átomo de nitrogênio Rafael C. Bernardi 97

do terminal da TTC (Figura 32). A forma carregada mostra duas camadas de fósforo nítidas ao redor do nitrogênio, uma a 0.5 nm e outra a 1.35 nm. A forma neutra apresenta uma redução significativa no valor de g(r) próximo ao fármaco, isto devido ao seu livre movimento ficando longe da interface entre a membrana e a água. A função g(r) nos dá indiretamente a energia de interação entre dois grupos. Neste caso, observamos que a energia de interação entre estes grupos, calculados pela equação de Helmholtz:

$$W(r) = -k_B T \ln g(r)$$

é de aproximadamente 1,77 Kcal/mol para a forma carregada, e 0,41 Kcal/mol para a forma neutra. Este resultado indica que a forma carregada tem uma posição mais estável de ancoramento próximo da interface membrana-água. Estes resultados corroboram com os vistos previamente, aonde observamos o caráter extremamente hidrofóbico das formas neutras da TTC e da LDC.



Figura 32: Análise da função de distribuição radial dos átomos de fósforo ao redor do terminal amina da tetracaína em suas formas protonada (vermelho) e neutra (preto). No detalhe a curva completa para a tetracaína carregada. Extraído de (Bernardi, et al., 2009).

Estes resultados nos ajudam a compreender a interação do anestésico com a membrana, mas nos impõem algumas questões. Como explicar o comportamento da benzocaína? Ao se manter próximo da interface, os fármacos carregados ajudariam mesmo na interação com canais iônicos? A primeira destas questões nós ajudamos a responder com uma análise do perfil de energia livre de partição na membrana deste fármaco. Também estudamos com métodos híbridos QM/MM se o nosso resultado exibido aqui não é um mero artefato do método utilizado.

4.3 – PERMEABILIDADE EM MEMBRANA:

Como discutido no capítulo de introdução, o transporte de moléculas através da membrana celular é muito importante para diversos processos biológicos. Muitos hormônios, pequenos peptídeos e outras classes de moléculas e fármacos cruzam a membrana celular sem a ajuda de uma proteína que assiste este processo. A difusão destas moléculas é um processo complexo, uma vez que a membrana celular é uma grande barreira. Uma visão da mecânica estatística sobre o problema é que uma molécula que pretende penetrar na célula, precisa mudar sua energia livre de partição na interface água-lipídio, utilizando, ou não, para isto a ajuda de outras substâncias. Consequentemente existe a necessidade de que estas moléculas mudem algumas propriedades estruturais da bicamada lipídica.

A membrana é um grande obstáculo para as moléculas devido ao seu caráter hidrofóbico na região central (caudas lipídicas) e hidrofílico na região da interface (cabeças polares dos fosfolipídios). Estas características tornam a interface membrana-água um ambiente extraordinário para moléculas anfifílicas, como alcoóis e alguns fármacos, como os anestésicos locais. Como vimos, a porção hidrofóbica destes fármacos interagem com as

caudas lipídicas, enquanto a porção hidrofílica interage com os grupos polares da região da cabeça lipídica (Dickey, et al., 2007) (Pedersen, et al., 2007) (Aagaard, et al., 2006). Estas interações levam a um alinhamento destas pequenas moléculas junto aos lipídios, perpendicularmente ao plano da membrana. Talvez por este motivo existam muitos estudos da interação destas moléculas com a membrana, entretanto nenhum utilizando modelagem molecular com uma ferramenta de mecânica estatística.

Nesta parte do trabalho nós escolhemos a molécula de etanol como teste, uma vez que esta é bem conhecida por mudar a permeabilidade da membrana a outros fármacos, assim como sua própria permeabilidade. Para compreender como este processo ocorre, nós utilizamos o método ABF (*Adaptative Biasing Force*) que pode nos fornecer o perfil de energia livre do etanol penetrando a membrana em diferentes concentrações.

O sistema álcool-membrana é ótimo para o estudo principalmente devido à enorme quantidade de resultados experimentais que podem nos ajudar a compreender o fenômeno que queremos observar (Leonenko, et al., 2004) (Bako, et al., 2008). Além disso, o etanol é uma molécula muito pequena, o que facilita muito o uso do método ABF, mas que nos ajuda a compreender o processo mesmo para moléculas maiores que possuam as mesmas características.

Os estudos na literatura indicam que há um aumento na pressão lateral da membrana provocado pelas moléculas de álcool. Eles mostram que o aumento da concentração de álcool reduz a tensão de superfície e afeta a pressão lateral tanto na região das cabeças como nas caudas lipídicas (Frischknecht, et al., 2006) (Terama, et al., 2008). Também foi sugerido que as mudanças na pressão através da membrana poderiam induzir mudanças nas proteínas de membrana, como os canais iônicos (Terama, et al., 2008) (Cantor, 1997). Além disso, devido a uma concentração de 3.0M de etanol, um aumento de cerca de 30% na Rafael C. Bernardi 100

área por lipídio é observado, tanto experimentalmente quanto com simulações computacionais (Dickey, et al., {2005}) (Ly, et al., 2004) (Leonenko, et al., 2004).

As mudanças provocadas na membrana pelo etanol podem explicar o uso desta molécula como um veículo para aplicação de fármacos. Para testar o que ocorre com o perfil de energia livre de um fármaco em duas concentrações diferentes de etanol, nós utilizamos a Benzocaína como fármaco para teste. Resultados experimentais utilizando pele de porco e anestésicos locais mostram que o etanol é capaz de aumentar o fluxo destes fármacos através da membrana.

Nosso trabalho tem como objetivo combinar dados termodinâmicos e estruturais, que devem nos ajudar a compreender a relação entre a membrana e o soluto anfifílico. Na literatura podemos encontrar análises da mudança da energia livre de partição de solutos homólogos, mas não conhecemos nenhum trabalho que tenha mostrado o perfil de energia livre nem dos anestésicos locais nem de qualquer álcool. Nesta parte do trabalho nós realizamos cálculos de dinâmica molecular da interação do sistema etanol-membrana, também benzocaína-membrana além de benzocaína-etanol-membrana. A membrana que utilizamos foi a SOPC (1-stearoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine), e o método utilizado para a obtenção do perfil de energia livre foi o método ABF (Adaptative Biasing Force). Nossas simulações foram realizadas com o campo de forças CHARMM27 implementado no software NAMD. Mais detalhes sobre estes cálculos são encontrados em anexo.

Cálculos utilizando o método ABF:

Utilizando métodos de dinâmica molecular próximos do equilíbrio, especificamente usando o método ABF (Adaptative Biasing Force), nós podemos obter o perfil de energia livre para uma molécula de etanol na interface membrana-água, em diferentes concentrações

deste álcool. Para isto analisamos uma "coordenada de reação" que se estende da molécula de referência até o centro da membrana, apenas no eixo Z, perpendicular ao plano da superfície da membrana, como o da Figura 29. Esta coordenada se inicia a -33.0 Å, do lado externo da membrana, até a posição no interior da membrana em -3.0 Å. As forças médias para a obtenção do PMF (Potencial de Força Média – do inglês: *Potential of Mean Force*) foram acumuladas a cada 0.1 Å.



Figura 33: Perfil de energia livre de partição na membrana para uma molécula de etanol em diferentes concentrações.

O perfil de energia livre para diferentes concentrações do etanol é mostrado na Figura 33, sendo fácil de notar que o perfil tem diferenças significativas dependendo da concentração. Neste trabalho não iremos discutir estes resultados, que seguem em anexo, apenas descreveremos nossas conclusões.



Figura 34: Perfil de energia livre de partição na membrana da molécula de benzocaína sozinha (preto) e na preseça de 650 mM de etanol (vermelho).

Quanto à benzocaína, o anestésico local que estávamos interessados no estudo, nós realizamos cálculos para obter o perfil de energia livre de uma única molécula deste fármaco na interface membrana-água, assim como de uma benzocaína em uma concentração de 650 mM de etanol (Figura 34). O perfil da benzocaína confirmou os resultados que havíamos obtidos com o cálculo convencional de dinâmica molecular clássica. O resultado mostra uma pequena barreira na entrada da região da membrana e então um poço de energia na região logo abaixo da fosfatidilcolina. A região central da membrana, região das caudas lipídicas, se mostra bastante inacessível.

Com relação ao efeito do etanol, nós podemos ver que o álcool faz o poço de mínimo de energia desaparecer, e a barreira de energia se torna menor para os anestésicos cruzarem a região central da membrana. Como esperado, podemos ver que a região de mínima energia para etanol e anestésico é a mesma, indicando uma competição destas duas moléculas pelo mesmo local.

Etanol como veículo para a entrega de fármacos:

Os efeitos do etanol na permeabilidade da membrana são muito conhecidos e fáceis de serem observados com a metodologia que aplicamos aqui. O etanol na membrana aumenta a sua permeabilidade assim como aumenta a permeabilidade de outras moléculas anfifílicas, mudando propriedades da membrana. Simulando um aumento da área por lipídio e também uma blindagem eletrostática nós observamos que estes devem ser os efeitos destas moléculas na membrana biológica.

Uma blindagem eletrostática devido ao acumulo de moléculas na região das cabeças polares causa uma completa perda da barreira para que as moléculas de etanol cruzem esta região dos fosfolipídios. Enquanto isto o aumento da área por lipídio leva a um inchaço da membrana, o que emula muito bem o que acontece com uma molécula de etanol na região das caudas lipídicas em uma alta concentração deste álcool. Este efeito aumenta a fluidez das caudas lipídicas e consequentemente reduz a barreira no centro da membrana, facilitando a penetração de outras moléculas. Uma síntese do domínio de cada uma destas perturbações é apresentado na Figura 35.

O modelo apresentado, criado a partir da análise do perfil de energia livre, sugere um mecanismo universal para o aumento da auto-partição de moléculas anfifílicas em membranas biológicas. Este modelo é importante para compreender o transporte assistido em membranas, uma vez que estas moléculas em uma concentração mais baixa terão menor chance de penetrar a membrana e precisam de ajuda para tal. Outro estudo que estamos realizando com a entrega de fármacos no meio intracelular, e que segue em anexo,

se refere ao uso de nanoestruturas de carbono como carreadores de fármacos que não podem cruzar a membrana.



Figura 35: Ilustração do perfil de energia livre do etanol em baixa (linha contínua) e alta concentração (linha pontilhada). Em vermelho indicamos a região onde há um domínio de blindagem eletrostática para o efeito da alta concentração do álcool e em amarelo uma região onde o aumento da área por lipídio é dominante.

4.4 – ESTABILIDADE DA BENZOCAÍNA POR QM/MM.

Como as simulações utilizando mecânica clássica mostravam um resultado diferente para a BZC, realizamos um novo teste com este sistema utilizando métodos mais acurados. Como discutido anteriormente, por apresentar um pKa próximo de 2.5, a Benzocaína (BZC) é o único anestésico local que não apresenta uma forma carregada em meio fisiológico. Apesar disto, como descrito nos capítulos anteriores, em nosso estudo vimos que a posição de estabilidade da BZC na região da membrana celular era a mesma que a de outros anestésicos locais carregados. Este estudo motivou-nos a compreender de que forma este fármaco se mantém "preso" nesta região. Utilizamos para isto o método QM/MM, uma vez

que as parametrizações de campos de forças não levam em conta as diferentes distribuições de cargas de moléculas em regiões de interface água/lipídio.

Partindo do resultado de dinâmica molecular clássica, em um sistema com uma molécula de BZC em uma membrana com 64 lipídios DPPC solvatada em água SPC, realizamos cálculos híbridos de dinâmica molecular clássica e quântica. Com a mecânica quântica, tratamos a molécula de anestésico local e os dois lipídios mais próximos da mesma, enquanto o restante do sistema foi tratado com mecânica clássica (Figura 36). A integração entre a dinâmica clássica e quântica foi realizada através da junção dos programas GROMACS 3.2 e CPMD durante um tempo de 8,0 ps, o que significa quase 120 mil horas de processamento eu um CPU XEON de 2.5 GHz.



Figura 36: Ilustração da membrana de DPPC com o anestésico local BZC. Em destaque vemos os átomos da BZC e dos dois lipídios mais próximos do fármaco, átomos estes que foram simulados utilizando mecânica quântica.

Nossos cálculos demonstraram uma maior proximidade da região da amina da BZC em relação à membrana, além de uma maior estabilidade nesta interação como mostra a

Figura 37. Esta maior proximidade sugere uma ligação bastante forte em comparação a uma ligação hidrogênio comum, indicando uma parcela significativa de ligação covalente à interação.

Para calcular a energia de ligação entre o anestésico e a membrana, utilizamos a função de distribuição radial (RDF) dos oxigênios do éster da DPPC em torno dos hidrogênios da amina da BZC (Figura 38). Com isto vimos que a energia associada a esta interação, quando realizamos esta dinâmica híbrida fica sendo da ordem de 6,5 vezes a energia térmica (k_BT). O que é maior do que a medida com métodos puramente clássicos, que são pouco mais de 5 k_BT. A distância média de equilíbrio entre estes dois grupos fica sendo da ordem de 1.29 Å com método QM/MM e 1.7 Å com o método de mecânica clássica.



Figura 37: Ilustração das três moléculas simuladas com o método quântico CPMD. Os hidrogênios dos lipídios foram retirados da imagem para facilitar a visualização. Note a forte interação entre os hidrogênios da amina da BZC e os oxigênios da carbonila da DPPC.

Uma vez que a membrana lipídica se comporta como um catalisador das interações biológicas, compreender a estabilidade da benzocaína na região de interface da bicamada pode ser de grande importância para o estudo do efeito anestésico local. Estes cálculos indicam que os métodos QM/MM são uma importante ferramenta no estudo das interações moleculares onde efeitos de polarização são desprezados pelos métodos clássicos. Vimos que a energia de ligação entre a amina do fármaco e o lipídio é bastante alta, sendo da ordem de 6,5 vezes a energia térmica. Os resultados com o método quântico então corroboram com os resultados obtidos com métodos puramente clássicos no sentido de que confirmamos que existe uma interação muito forte entre a amina do fármaco e a cabeça polar do lipídio. Entretanto o resultado obtido com o método quântico indica uma maior proximidade entre os átomos das duas moléculas.



Figura 38: Função de distribuição radial dos átomos de oxigênio do grupamento palmitoil da DPPC em relação aos hidrogênios do terminal amina da BZC.

4.5 – CANAL TREK-1:

No capítulo de introdução discutimos a importância dos canais iônicos no efeito anestésico. Nossos estudos com membranas modelo nos levaram a pensar em um próximo passo, onde estudaríamos a interação de anestésicos locais com canais iônicos. Estudos recentes indicam que o maior alvo destes fármacos é o canal de sódio. Entretanto este canal é muito grande e possui uma estrutura que parece ser muito complexa e que ainda não é conhecida. Um outro canal que tem mostrado importância tanto para o efeito anestésico local e principalmente para o efeito anestésico geral é o TREK-1, um canal de potássio com estrutura em dímero e que possui dois poros em tandem.

O TREK-1 foi o primeiro canal mecano-ativado de mamífero a ser clonado, expressado e caracterizado. Os lipídios parecem desempenhar um papel fundamental na modulação do canal e evidências recentes, tem mostrado que existe uma íntima ligação entre os lipídios da membrana e o mecanismo de abertura e fechamento de outros canais mecanosensíveis em fungos, plantas e alguns animais.

Como já discutimos anteriormente, o estudo com ratos knockout TREK-1^{-/-} nos dão evidências muito fortes da importância deste canal de potássio. Este tipo nada convencional de canal, com um mecanismo de *gating* bastante complexo e que pode ser modulado por receptores de membrana e mensageiros secundários, apresenta um papel fundamental na neuroproteção, sensação de dor e depressão. Além disso, o TREK-1 é aberto por agentes neuroprotetores e anestésicos gerais, enquanto é inibido por drogas antidepressivas, se mostrando um importante alvo farmacológico.

A atividade do TREK-1 é estimulada de diversas formas o que o qualifica como um canal iônico sensorial com regulagem polimodal, que integra diversos estímulos químicos e

físicos. As evidencias até então mostram que a porção C-terminal deste canal tem uma grande importância na transdução dos estímulos para a região do poro e conseqüente modulação do *gate*. O modelo proposto até agora revela uma enorme importância do acoplamento entre a região C-terminal, ilustrada na Figura 39, e a camada intracelular da membrana celular. Estes estudos contribuem para um melhor entendimento da importância do TREK-1 e dos canais K_{2P} de maneira geral, além de uma base para o compreendimento do seu mecanismo de mecanotransdução, porém não existe um modelo preciso no nível molecular.



Figura 39: Ilustração da topologia dos canais K_{2P} . A região transmembranar possui quatro α hélices (M_1 a M_4) principais e duas menores que formam o filtro de seletividade (P_1 e P_2). Estão também representados os terminais da proteína, ambos na região intracelular.

Apesar do enorme progresso no estudo e caracterização dos canais K_{2P}, diversas questões de grande importância permanecem em aberto, entre elas o que faz o TREK-1 ser mecanosensível e qual o mecanismo de transmissão da força para o canal? Também queremos saber qual o mecanismo de ativação do TREK-1 por anestésicos? Neste capítulo investigaremos este canal através de cálculos de dinâmica molecular. Para isto usaremos o modelo do canal construído utilizando ferramentas de bioinformática a partir de sua sequência primária.

Construção do Modelo:

O modelo do canal TREK-1 que utilizamos foi feito pelo Prof. Werner Treptow, durante seu pós-doutorado na University of Pennsylvania e foi publicado recentemente (Treptow, et al., 2010). A sequência primária do canal (gene: KCNK2) foi obtida do servidor Swiss-Prot (P97438). Uma vez que a região N-terminal do canal não apresentava efeito na função da proteína (Patel, et al., 1998) (Maingret, et al., 2002), apenas a região transmembranar (região do poro) e a região C-terminal foram construídas. A estratégia utilizada consistia na construção do modelo da estrutura separadamente para cada uma das partes.

Então, utilizando métodos de modelagem comparativa, estruturas homólogas foram selecionadas no Banco de Dados de Proteínas (PDB – *Protein Data Bank*). Para fazer a busca foi empregado o algoritmo FASTA, que alinha as sequências primárias da estrutura desconhecida com a sequência de estruturas depositadas no PDB, nos dando uma lista de possíveis proteínas homólogas, classificadas de acordo com a sua similaridade.

Com este método, a estrutura cristalográfica do canal de potássio KcsA da bactéria *Streptomyces lividans* foi escolhida como molde para a construção da região TM do TREK-1 em seu estado fechado. Esta estrutura apresenta uma similaridade em sua sequência primária de cerca de 70% com o TREK-1. A região C-terminal do TREK-1 se mostrou muito diferenciada de qualquer outra estrutura conhecida na família dos canais de potássio. Para construir um modelo para a estrutura desta região a estrutura cristalográfica da fosfatoacetiltransferase (ACTR) do *Bacillus subtilis* foi selecionada, apresentando uma similaridade de aproximadamente 54%. A Figura 40 mostra o alinhamento das sequências do TREK-1 com as sequências dos moldes, bem como a predição para a estrutura secundária. Para gerar os modelos iniciais para a estrutura foi então utilizado o software Modeler.

Rafael C. Bernardi

111

Após uma minimização de energia conformacional o modelo do canal foi inserido em uma membrana lipídica, para um refinamento por dinâmica molecular. O canal foi inserido no centro de *patch* de membrana de SOPC, como mostra a Figura 41. O sistema completo inclui cerca de 160 mil átomos, sendo composto pelo canal TREK-1, cerca de 425 moléculas de lipídio, aproximadamente 40 mil moléculas de água, além de 2 íons potássio no filtro de seletividade e 14 íons cloro para neutralizar a carga da solução. A Figura 41a ilustra o tamanho da cavidade na membrana criada para inserir o canal.



Figura 40: Alinhamento das sequências do TREK-1 e dos moldes utilizados. Os dois primeiros blocos correspondem ao alinhamento com a estrutura do KcsA e o último bloco corresponde ao alinhamento com o ACTR. A primeira linha de cada bloco corresponde a sequência do TREK-1 e a terceira linha a sequência do molde. A segunda e quarta linha indicam a estrutura predita e do molde respectivamente.



Figura 41: Estrutura inicial do TREK-1 em um patch de SOPC, vista do meio extracelular (a) e vista lateralmente (b). A estrutura foi gerada pelo software Modeler e a imagem pelo VMD.

Quatro simulações de dinâmica molecular para refinar o sistema foram realizadas com ensemble NPT e utilizando o pacote NAMD2. Condições periódicas de contorno foram aplicadas e o passo de tempo da dinâmica foi de 2.0 fs. Os métodos da Dinâmica de Langevin e do Pistão de Langevin foram aplicados para manter a temperatura e a pressão constantes em 300 K e 1.0 atm respectivamente. Para as interações de longo alcance o método de Ewald PME foi utilizado. Cada uma das dinâmicas foi realizada por cerca de 320 ns utilizando recursos do Pittsburgh Supercomputer Center. Especificamente em cada simulação eram utilizados 384 processadores AMD Opteron 2.6 GHz, de um supercomputador modelo CRAY-XT3.

Rafael C. Bernardi

113



Figura 42: Ilustração do acoplamento da região C-terminal com a membrana lipídica. As cores indicam o tipo dos aminoácidos: Azul (positivamente carregado), Vermelho (negativamente carregado), Amarelo (apolar), Verde (polar). Note que existe uma inserção de aminoácidos carregados no interior da membrana (em cinza translucido).

Todas as quatro simulações apresentaram um resultado similar no final, mostrando que a região C-terminal tem um grande acoplamento com a membrana celular, como esperado devido aos resultados experimentais existentes (Figura 42). O modelo inicial (Figura 40) com o domínio C-terminal estirado para dentro da célula não nos parecia muito correto, devido às evidências experimentais, e as simulações realizadas levaram o canal para uma estrutura mais próxima da esperada. Como a proteína é um dímero podemos dizer que tínhamos oito estruturas sendo testadas, aumentado ainda mais a confiabilidade em nossos resultados. Este modelo de estrutura foi então simetrizado novamente, ou seja, escolhemos um dos segmentos que apresentavam uma estrutura mais organizada e que correspondia melhor com a literatura para ser simetrizado na formação do dímero novamente, como no modelo da Figura 43.



Figura 43: TREK-1 simetrizado na membrana de POPC. Este sistema foi utilizando para iniciarmos os estudos de modulação dos canais K_{2P}.

Como iniciaríamos os testes para a modulação do canal, simetrizamos o sistema para estrutura que mais concordava com as previsões experimentais. Esta estrutura foi inserida em uma membrana de POPC (1-palmytoil-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine), e um novo sistema foi montado. Também construímos um sistema com o canal truncado no resíduo de aminoácido TYR₂₄₂, retirando 74 resíduos de aminoácidos e reduzindo a porção C-terminal para apenas a região da α -hélice, como ilustrado na Figura 44. Como já discutido, trabalhos realizados por experimentalistas mostraram que esta porção do canal é sensível a uma grande parte dos estímulos que o canal recebe. Para uma melhor compreensão da porção que foi retirada, a Figura 45 ilustra apenas a região do C-terminal da proteína. Note que a conexão entre o final da região C-terminal e a região TM é feita por uma grande α -hélice, que também seria responsável por boa parte da sensibilidade do canal (Honoré, 2007).



Figura 44: Sistema com o TREK-1 truncado na região C-terminal, no resíduo de aminoácido TYR₂₄₂, inserido em uma membrana de POPC.



Figura 45: Ilustração da estrutura secundária da região C-terminal do TREK-1 após aproximadamente 400 ns de dinâmica molecular.

Estes dois sistemas foram submetidos a uma nova minimização de energia conformacional e em seguida uma dinâmica molecular para um relaxamento destas estruturas. Os sistemas completos incluem cerca de 200 mil átomos, sendo composto pelo canal TREK-1, cerca de 650 moléculas do lipídio, aproximadamente 50 mil moléculas de água, além de dois íons potássio no filtro de seletividade e 14 átomos de cloro agindo como contra-íons (Figura 46).



Figura 46: Ilustração do sistema simulado, mostrando a membrana de POPC cortada para facilitar a visualização do canal. A superfície em azul transparente ilustra as moléculas de água, dando uma idéia do tamanho do sistema simulado.

Modulação do TREK-1:

Para testar como diferentes estímulos são transferidos ao canal realizamos diversos cálculos de dinâmica molecular para cada um dos modelos de canais. Primeiramente realizamos uma simulação controle, onde nenhum estímulo era aplicado. Também testamos como seria o sistema ao estar em um pH ácido. Além disto, testamos o que ocorre quando há o estiramento da membrana, aplicando tensões a mesma. Por último utilizamos a técnica de Steered Moleular Dynamics (SMD) para testar uma abertura forçada do canal, aplicando tensões na proteína. A Figura 47 ilustra os cálculos que foram realizados.

A simulação de nova minimização de energia e uma nova simulação de e de controle por cerca de 100 ns, o que mostrou que a estrutura secundária do canal continuou bastante estável, como indica o gráfico da Figura 48. Observa-se na figura, que a α-hélice da porção C-terminal, que seria responsável pela recepção de boa parte dos estímulos recebidos por este canal, é mantida durante toda a simulação em ambos os sistemas. O acoplamento desta α -hélice à membrana nas duas simulações controle (TREK-1 completo e truncado na TYR₂₄₂) é ilustrado na figura Figura 49. Verifica-se que, especialmente devido aos 74 resíduos de aminoácidos extras, a α -hélice do sistema completo (a) não apresenta maior interação com a membrana. O acoplamento neste caso é feito mais pela porção que fica além deste domínio. No sistema truncado (b) a região da α -hélice apresenta uma grande interação com a membrana, especialmente os últimos resíduos de amino-ácido deste domínio.



Figura 47: Esquema com as simulações realizadas. Somando o tempo computacional de todas as simulações do TREK-1 utilizamos cerca de cinco milhões de horas de CPU.



Figura 48: Análise da estrutura secundária de um dos monômeros do canal TREK-1, durante a nova dinâmica molecular, realizada na membrana de POPC. Em preto as regiões de α -hélice, em laranja as regiões com grampos e em cinza claro as regiões sem estrutura secundária definida. A ilustração a direita indica qual região da membrana estamos representando: em azul as quatro grandes α -hélices transmembranares (M_1 - M_4); em amarelo as α -hélices da região do filtro de seletividade (conforme esquema da Figura 39); em rosa a α -hélice principal da região C-terminal; em verde pequenas α -hélices do terminal.



Figura 49: Ilustração do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios (principalmente as cabeças lipídicas) da membrana após aproximadamente 400 ns de simulação (300 ns em uma membrana de SOPC seguidos por 100 ns em uma membrana de POPC). À esquerda o C-terminal completo e a direita a simulação com a região C-terminal truncada no resíduo TYR₂₄₂. As cores indicam o tipo dos aminoácidos: Azul (positivamente carregado), Vermelho (negativamente carregado), Amarelo (apolar), Verde (polar).

Em uma primeira análise visual da dinâmica do canal notamos que a região C-terminal é ligada à região do poro por um domínio bastante flexível, o qual permite um movimento hora acoplado hora desacoplado da região C-terminal à membrana como verifica-se nas análises a seguir. Pelas trajetórias atômicas notamos que este acoplamento é perdido diversas vezes, voltando a surgir em seguida como no modelo da Figura 50. Para melhor investigarmos esta observação, fizemos um gráfico do ângulo de inclinação da α -hélice em relação ao plano da membrana versus tempo. Neste gráfico investigamos como a hélice gira em torno do resíduo THR₂₀₈ que funciona como um pivô para este movimento (Figura 51). Este gráfico mostra como este movimento ocorre de forma oscilante.



Figura 50: Ilustração do movimento do domínio C-terminal do TREK-1, com destaque para a região da α-hélice (em vermelho) e para o restante da região terminal (em verde).



Figura 51: Gráfico do ângulo de inclinação da α -hélice da região C-terminal em relação ao plano da superfície da membrana. Um valor de sen θ =0 indica que a α -hélice se encontra paralela a superfície da membrana, enquanto que sen θ =1 a indica como estando perpendicular a bicamada.

Os resultados estão de acordo com a literatura (Honoré, 2007), mas devemos lembrar que uma membrana biológica real é composta por uma mistura de diversos lipídios, sendo sua superfície intracelular composta por muitos lipídios carregados negativamente. A Figura 49 mostra que alguns resíduos positivamente carregados (representados em azul) estão frequentemente expostos à água e que uma membrana negativamente carregada poderia atraílos com uma força maior, de forma a reduzir a freqüência desta oscilação da α-hélice da região C-terminal. Na Figura 52 é representada a superfície eletrostática do TREK-1 mostrado que existe uma grande área positivamente carregada que está esposta ao solvente ao invés de interagindo com a membrana. Apesar disto nosso modelo aparenta ser satisfatório, uma vez que existe este acoplamento entre a região C-terminal e a membrana como previsto experimentalmente. Após esta primeira análise passamos aos novos testes que discutiremos a seguir em tópicos separados.



Figura 52: Superfície eletrostática do TREK-1 na sua conformação após a dinâmica molecular, obtida utilizando o software Pymol (www.pymol.org), com a ferramenta APBS.

Devido ao alto custo computacional e das evidências experimentais, selecionamos somente alguns sistemas para realizar dinâmicas mais longas que seguem analisadas a seguir. Estudamos o estiramento da membrana para o canal TREK-1 completo, o efeito da acidificação do meio intracelular para o TREK-1 truncado e realizamos um cálculo de SMD para o sistema cortado. O efeito da presença de anestésicos foi estudado com o canal completo, uma vez que os resultados experimentais indicam uma maior potência dos mesmos neste caso (Bayliss, et al., 2008) (Honoré, 2007).

Estiramento da membrana:

Aplicando uma força lateral na membrana de modo a provocar uma expansão da mesma, como ilustrado na Figura 53, realizamos um estudo da mecanoativação do TREK-1. Esta pressão negativa nas paredes da membrana gera uma tensão de superfície que é aumentada aos poucos de forma a simular um estiramento natural da membrana, com um acrécimo de tensão variando de 0 a 100 dyn/cm².



Figura 53: Ilustração do método de estiramento da membrana. No eixo z, perpendicular ao plano da superfície da membrana, a pressão continua em 1.0 atm.

Rafael C. Bernardi

122

Acreditamos que o mecanismo de modulação do canal TREK-1 passa pelo melhor acoplamento da região C-terminal quando sob influência de alguns estímulos, o que aumentaria sua sensibilidade aos movimentos naturais da membrana. Uma análise do acoplamento da região C-terminal a membrana indicou que existe um aumento na interação entre estes dois grupos quando uma pressão lateral é aplicada na membrana. Para tal, analisamos o número de ligações de hidrogênio durante 100 ns de simulação, tanto para uma dinâmica de controle, quanto para a MD onde aplicamos esta tensão de superfície. O resultado (Figura 54) indica que existe um aumento de até três vezes no número de ligações de hidrogênio entre o canal e a membrana.



Figura 54: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios de POPC da membrana. Acompanhamos o número de ligações de hidrogênio durante 100 ns de simulação por MD para o sistema controle (preto) e o sistema sob influência da tensão de superfície (vermelho).

O acoplamento da região C-terminal com a membrana faz com este "braço" da proteína se desloque junto com a membrana, acompanhando o deslocamento dos lipídios. Isto faz com que uma força lateral seja aplicada à região do poro, provocando a abertura e fechamento do mesmo em um movimento rotacional, como mostraremos mais adiante. Este poderia então ser o mecanismo de mecanosensibilidade destes canais.

Acidificação da região intracelular:

O pKa dos aminoácidos ASP e GLU é respectivamente 3.9 e 4.3, o que faz com que em um microambiente com pH ácido o suficiente estes resíduos possam estar na sua maioria protonados, neutralizando suas cargas. Mudando o estado de protonação destes resíduos e adicionando os contra-íons necessários para neutralizar a carga do sistema, iniciamos duas novas simulações por dinâmica molecular, uma para o canal completo e outra pra o canal truncado na TYR₂₄₂.

Observando o acoplamento da região C-terminal com a membrana notamos que a forma completa do canal não apresentaria uma grande interação com a membrana, pelo menos não em uma escala de tempo que poderíamos observar. Este acoplamento parece melhor no sistema cortado principalmente devido ao fato de que a falta da porção final da proteína facilita o movimento da região C-terminal. Não vemos isto na proteína completa devido à falta de tempo de simulação para tal, especialmente pelo fato de que esta grande porção C-terminal precisaria de uma caixa de simulação maior, deixando o cálculo ainda mais lento. Como os custos computacionais seriam muito altos prosseguimos com o cálculo apenas para o sistema cortado.

A Figura 55 mostra como o sistema truncado apresenta um bom acoplamento da região C-terminal da proteína com a membrana. Nota-se que os aminoácidos positivamente carregados agora interagem mais com a membrana, o que deve aumentar a energia de Rafael C. Bernardi 124

acoplamento entre estes dois grupos. Para analisar isto de uma forma indireta, monitoramos o número de ligações de hidrogênio durante 100 ns de simulação, tanto para uma dinâmica de controle, quanto para a MD onde alteramos o estado de protonação dos aminoácidos. O resultado (Figura 56) indica que existe um aumento substancial no número de ligações de hidrogênio entre o canal e a membrana.



Figura 55: Ilustração do acoplamento do C-terminal do TREK-1 com a membrana de POPC. a: sistema controle (em azul aminoácidos que foram protonados na simulação em pH ácido); b: sistema em pH ácido (em azul aminoácidos que foram protonados); c: detalhe do sistema em pH ácido, mostrando as cadeias laterais de todos os aminoácidos da região C-terminal, sendo os aminoácidos em azul positivamente carregados. A membrana aparece em representação semi-transparente, estando as cabeças lipídicas em vermelho.



Figura 56: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios de POPC da membrana. Acompanhamos o número de ligações de hidrogênio proteína-membrana durante 100 ns de simulação por MD para o sistema controle (preto) e o sistema simulando um pH ácido (vermelho).

Steered Molecular Dynamics:

Antes de realizarmos os cálculos aplicando tensão na membrana e simulando um pH ácido, realizamos simulações com o método de Steered Molecular Dynamics (SMD). Com a técnica de SMD puxamos a α-hélice, com um potencial de mola, com diversos valores de constante de força, de forma a tentar uma abertura do canal e assim testar se este seria o mecanismo correto de abertura. Esta técnica interfere na dinâmica direcionando movimentos, mas pode nos indicar se estamos no caminho correto. Aplicamos uma força puxando a αhélice pela região C-terminal de um dos segmentos e fixando a outra, como ilustrado na Figura 57.


Figura 57: Ilustração da aplicação do método de SMD, onde fixamos a posição dos C_{α} da região C-terminal de um dos monômeros (em azul), enquanto puxamos os C_{α} do outro monômero (vermelho), para a esquerda (na representação acima).

Nossos resultados mostram uma pequena abertura do poro, porém a força que aplicamos era muito grande e houve um princípio de desenovelamento do canal. Testes mais lentos poderiam ser aplicados para que a força não provocasse o desenovelamento, mas como isto custaria muito recurso computacional, decidimos investir nas outras técnicas que teriam um resultado mais direto e completo.

Discussão sobre a modulação do TREK-1:

Como discutido, tanto a acidificação quanto à pressão lateral aumentam o acoplamento da região C-terminal do TREK-1 com a membrana e isto poderia ser o mecanismo chave da mecanosensibilidade do canal. Uma possível explicação para o mecanismo seria que este aumento na interação proteína-membrana faz com que haja a formação de rafts de lipídios. Estas pequenas jangadas de lipídio são formadas pela mudança na fluidez da membrana causada localmente por grupos que interagem com os Rafael C. Bernardi 127

fosfolipídios, no caso pela porção C-terminal que interage com uma porção de lipídios que por sua vez não interagem com a região do poro do canal, como mostra a Figura 58, e podem "andar" pelo restante da membrana que é mais fluida.



Figura 58: Ilustração dos rafts de lipídio. a: destaque para os lipídios de POPC que estão a até 3.5 Å de distância da porção C-terminal; b: TREK-1 e os lipídios que estão a até 3.5 Å de distância deste canal. Note que existe um espaço entre os lipídios da região do poro e da região C-terminal. Este espaço é preenchido por lipídios que não estão interagindo diretamente com o canal e formariam uma fase mais fluídica.

Este modelo parece pertinente, mas para comprovar esta teoria teríamos que realizar simulações muito mais longas que teriam que levar a uma abertura completa do *gate* do canal. Nas simulações que realizamos não vimos uma abertura completa do canal, mas começamos a observar movimentos neste sentido na região TM. A Figura 59 ilustra, do ponto de vista intracelular, o poro do canal parcialmente aberto com as perturbações que realizamos. Um dos prováveis motivos já foi discutido, que é o fato de nesta simulação utilizarmos um modelo de membrana zwitteriônica, o que provavelmente subestima as interações entre o domínio C-terminal e os fosfolipídios.



Figura 59: Vista do poro do canal sob a influência de diferentes estímulos. Note uma pequena abertura do gate do canal em todas as simulações, exceto na MD de controle.

TREK-1 e o efeito anestésico geral:

Como já discutido, o TREK-1 parece ter um relação muito importante com o mecanismo do efeito anestésico geral. Para tentar compreender o que ocorre com o canal quando esta sob efeito do anestésico geral Isoflurano, realizamos cálculos com o sistema anestésico-canal-membrana, ilustrado na Figura 60. Nesta simulação retiramos algumas moléculas de água criando cavidades para a inclusão das moléculas de Isoflurano, numa concentração de aproximadamente 80 mM, ou seja, uma fração molar de cerca de 10% em relação aos lipídios. Uma dinâmica molecular de cerca de 300 ns foi realizada e observamos novamente um princípio de abertura do canal, porém uma abertura maior do que já havíamos observado com os demais estímulos.



Figura 60: Ilustração – Ilustração do sistema com o anestésico geral Isoflurano na água, condição inicial para o cálculo que realizamos para estudar a influência deste fármaco no canal TREK-1.

Partindo de um modelo inicial um pouco diferente, uma segunda MD foi realizada por cerca de 120 ns. Nesta simulação utilizamos um monômero diferente do utilizado para simetrizar o canal, como descrito anteriormente, para termos mais evidências do nosso Rafael C. Bernardi 130 modelo. As duas simulações de MD indicaram uma pequena abertura no canal após pouco mais 70 ns de simulação. Como nas demais simulações esta abertura não é ainda uma abertura completa do *gate*, mas começa a indicar um pouco melhor do que nos outros casos, o movimento que poderia provocar a abertura do mesmo. Notamos nestas simulações que o poro é fechado por um *gate* hidrofóbico composto por quatro resíduos de leucina. Estes resíduos formam um estrangulamento no poro que precisa ser aberto para liberar o fluxo de íons (Figura 61).



Figura 61: Canal TREK-1 com destaque para a região do filtro de seletividade (verde) e para o gate de leucinas (amarelo). As esferas em azul e em branco indicam os átomos de fósforo da cabeça polar dos lipídios para a camada extracelular e intracelular respectivamente.

Como já discutimos, acreditamos que o mecanismo de modulação do canal TREK-1 está diretamente relacionado com acoplamento da região C-terminal aos lipídios da membrana. Quando sob a influência de alguns estímulos este acoplamento seria maior, o que aumentaria a sensibilidade do canal aos movimentos naturais da membrana. Uma análise do acoplamento da região C-terminal a membrana indicou novamente que existe um aumento na interação entre estes dois grupos quando aplicamos um estímulo que sabemos que abre o canal. Analisamos novamente o número de ligações de hidrogênio durante 100 ns de simulação, de aproximadamente 270 nanosegundos, tanto para uma dinâmica de controle, quanto para a MD onde incluímos os anestésicos. A primeira parte da simulação foi descartada para que houvesse tempo para a partição do Isoflurano na membrana. O resultado (Figura 54) indica que existe um aumento de cerca de três a quatro vezes no número de ligações de hidrogênio entre o canal e a membrana, na presença do anestésico.



Figura 62: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios de POPC da membrana. Acompanhamos o número de ligações de hidrogênio durante 100 ns de simulação por MD para o sistema controle (preto) e o sistema com anestésicos (vermelho).

Esta grande melhora no acoplamento entre a região C-terminal do TREK-1 e os lipídios é um grande indicativo do modelo de modulação do canal. Porém ainda não temos Rafael C. Bernardi 132

uma abertura do *gate* para poder ver como este movimento ocorre na região do poro. Como os movimentos da região TM indicam um princípio de abertura do canal, realizamos a partir da trajetória das trajetórias de MD do sistema na presença do Isoflurano, uma análise de componentes principais (PCA) da dinâmica. Esta análise indicou o movimento de abertura e fechamento do poro do canal (Figura 63). Este tipo de análise é um procedimento matemático que transforma um grande número de variáveis correlacionadas em um pequeno número de variáveis chamadas componentes principais (PCA) (Cukier, 2010). O resultado é um movimento "filtrado" que mostra apenas os principais movimentos de grande amplitude da proteína, que geralmente estão associados à função biológica (Floquet, et al., 2009). No TREK-1 o principal componente desta análise indica um movimento de rotação global da parte transmembranar do canal, de forma que as hélices M₂ e M₄ se alinham afastando as leucinas uma das outras.

A análise de PCA nos fornece uma predição da amplitude do movimento, que levaria a abertura do poro. Um cálculo forçando este estado final do PCA mostra um canal completamente aberto após poucos nanosegundos de dinâmica. Neste cálculo colocamos a posição dos carbonos alfa das hélices M_2 e M_4 como um alvo para a dinâmica. Fizemos isto impondo restrições de posição para estes átomos nas posições indicadas pela análise. Matematicamente é como se houvesse uma mola puxando estes C_{α} para a posição que o PCA indicou. Como este movimento era forçado, rapidamente víamos a abertura do poro. Após manter o vínculo por cerca de cinco nanosegundos retiramos este vinculo de restrição de posição e vimos este estado aberto se manter durante os 10 ns avaliados.

Rafael C. Bernardi

133



Figura 63: Ilustração da análise de PCA, indicando o movimento rotacional na região TM do canal TREK-1. As setas indicam o sentido e a amplitude do movimento de cada um dos C_{α} da proteína.

O canal aberto então deve se parecer com a ilustração da Figura 64, porém o mecanismo completo de *gatting* não pôde ser observado, provavelmente pela escala de tempo de simulação. Também a interação com os fosfolipídos zwitteriônicos não deve ser a forma ideal de estudar este sistema. A escolha por estes lipídios se deu pela maior confiabilidade do modelo de membrana. Iniciar este trabalho com um modelo não confiável de lipídio poderia nos levar a conclusões errôneas e que não indicariam o real mecanismo de gatting dos canais K_{2P} .



Figura 64: llustração da abertura do canal por dois pontos de vista, de dentro da célula (acima) e lateralmente (abaixo). Em cinza a representação da estrutura secundária do canal, em amarelo o gate de leucinas e em vermelho e branco as moléculas de água próximas do poro. a: O canal TREK-1 apresenta uma pequena abertura após os cálculos de MD na presença do anestésico geral Isoflurano; b: Utilizando as posições finais dos C_a das hélices M_2 e M_4 na análise de PCA como vínculo, observamos uma pequena abertura do canal, suficiente para haver um filamento de água atravessando o poro; Liberando os vínculos observamos que o canal passa a estar completamente aberto, com a região do gate hidrofóbico completamente hidratada.

4.6 – TREK-1 EM MEMBRANAS MISTAS DE POPC/POPS:

Como discutido, a membrana biológica possui uma alta concentração de fosfolipídios negativamente carregados na camada intracelular. Para tentar simular a conseqüência destes lipídios no acoplamento da região C-terminal, inserimos o canal em uma membrana

composta por cerca de 30% de lipídios de POPS (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine*). Uma vez que colocar os lipídios carregados em apenas uma das camadas geraria artefatos de simulação, especialmente devido às condições periódicas de contorno, decidimos colocar esta mesma proporção de lipídios em ambas as camadas. Para agilizar os cálculos de minimização, ao invés de colocar o canal em uma membrana completamente nova, substituímos uma parte dos lipídios de POPC de nossa membrana, que vínhamos usando como controle, por lipídios POPS e adicionamos os contra-íons necessários. A Figura 65 ilustra a distribuição de lipídios na membrana antes de iniciarmos a dinâmica.



Figura 65: Vista da bicamada mostrando a superfície com diferentes lipídios, POPC (azul) e POPS (amarelo).

Após uma dinâmica molecular de aproximadamente 100 ns observamos visualmente que havia um melhor acoplamento entre a membrana e o domínio C-terminal. A Figura 66 mostra como o TREK-1 apresenta um bom acoplamento da região C-terminal da proteína com os lipídios de POPS. Note que os aminoácidos positivamente carregados interagem Rafael C. Bernardi 136 mais com a membrana, o que deve aumentar a energia de acoplamento entre estes dois grupos. Para verificar isto de uma forma indireta, analisamos o número de ligações de hidrogênio durante 100 ns de simulação, tanto para uma dinâmica de controle, quanto para a MD onde incluímos os lipídios negativamente carregados. O resultado (Figura 67) indica que existe um aumento substancial no número de ligações de hidrogênio entre o canal e a membrana.



Figura 66: Ilustração mostrando o acoplamento entre o domínio C-terminal do TREK-1 e os lipídios POPS, com destaque para as ligações de hidrogênio (representadas pelas linhas tracejadas em rosa). Na figura mostramos apenas os lipídios que estão a até 3.5 Å de distância dos aminoácidos da região C-terminal do canal. As cores indicam o tipo dos aminoácidos: Azul (positivamente carregado), Vermelho (negativamente carregado), Amarelo (apolar), Verde (polar).

Como esperado, o acoplamento da proteína à membrana é melhorado pela presença de lipídios negativamente carregados. Este melhor acoplamento, tanto com os lipídios como com os anestésicos, com o estiramento e em meio ácido indica ser fundamental para a modulação do canal. Provavelmente isto faz com que o canal consiga sentir melhor os esteja

mais sujeito aos movimentos naturais da membrana (Figura 68), como já havia sido proposto por estudos experimentais (Honoré, 2007). Um outro passo importante que devemos tomar em breve é o estudo do canal TREK-1 em um modelo de membrana como este (Figura 69), onde poderíamos estudar se o melhor acoplamento do canal a membrana o faz abrir induzido pela curvatura da mesma, como proposto em diversos trabalhos (Patel, et al., 1998).



Figura 67: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios da membrana. Acompanhamos o número de ligações de hidrogênio durante 100 ns de simulação por MD para o sistema controle (preto) e o sistema com POPS (vermelho).



Figura 68: Ilustração do movimento oscilatório da membrana. Incluindo as moléculas de água para solvatar esta membrana, este sistema possui cerca de 2.5 milhões de átomos tornando sua simulação impraticável atualmente.



Figura 69: Ilustração do modelo de membrana de POPC curvada e com o canal TREK-1. O modelo seria uma tentativa de reproduzir o efeito do ácido-araquidônico na membrana, que faz com que haja a abertura do canal.

4.7 – O CANAL TREK-1 E O EFEITO ANESTÉSICO LOCAL:

Aboramos no primeiro capítulo o fato de que os canais K_{2P}, em especial o canal TREK-1, também possuem um papel importante no efeito anestésico local. Em uma primeira análise do comportamento do TREK-1 na presença dos LAs (Figura 70), empregando a benzocaína estudamos o acoplamento da região C-terminal com a membrana. Para tal

analisamos o número de ligações de hidrogênio durante 100 ns de simulação, como vínhamos fazendo nas outras análises, tanto para uma MD de controle quanto para a MD onde incluímos os lipídios negativamente carregados. O resultado (Figura 71) indica que existe um aumento substancial no número de ligações de hidrogênio entre o canal e a membrana. Este aumento poderia melhorar a sensibilidade do canal aos movimentos da membrana, tornando o canal mais suscetível a abertura. Porém evidências experimentais indicam que os anestésicos locais agiriam fechando o canal TREK-1 (Punke, et al., 2003). Uma explicação seria que trabalhos recentes sugerem sítios de ligação para os LAs no TREK-1. Esta ligação poderia então ser responsável pelo fechamento do *gate* do canal, ou mesmo pelo "entupimento" do mesmo.



Figura 70: Ilustração do sistema com o anestésico local Benzocaína (em laranja) e o canal TREK-1 em uma membrana de POPC.



Figura 71: Gráfico do acoplamento entre a região C-terminal e os lipídios da membrana. Acompanhamos o número de ligações de hidrogênio durante 100 ns de simulação por MD para o sistema controle (preto) e o sistema com o anestésico local benzocaína (vermelho).

Este foi apenas um estudo preliminar que pode nos guiar em novos cálculos com o TREK-1 e os anestésicos locais. Estes estudos devem ser mais complexos do que os que temos realizado com o anestésico geral Isoflurano, uma vez que a relação entre o TREK-1 e o efeito anestésico local parece ser mais sistêmica do que um efeito direto como no caso da anestesia geral.

5 – CONCLUSÃO:

Diversos tipos de cálculos foram realizados neste trabalho, em uma caixa d'água, a dinâmica molecular nos mostrou que os anestésicos locais se comportaram da maneira esperada, a TTC se mostrou o anestésico com o grupo amina mais hidrofílico quando protonado, seguido da PRC e da LDC. Isto indicaria que esta seria a ordem na qual o anestésico sofreria maior dificuldade em penetrar a membrana, o que concorda com os resultados experimentais de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

As simulações com anestésicos locais em membranas nos mostraram que a forma carregada destes fármacos sofre maior dificuldade para atravessar a membrana, enquanto a forma neutra deverá se difundir na mesma com facilidade. A benzocaína por sua vez apresentada apenas a forma neutra em pH fisiológico porém se comporta como um anestésico local carregado, também instalando-se na interface membrana-água e perpendicularmente a esta. Este resultado foi corroborado utilizando métodos de cálculo de perfil de energia livre para cruzar a membrana. Também testamos se este não seria um efeito da simulação por dinâmica molecular por um método puramente clássico. Para tal realizamos cálculos utilizando o método híbrido de QM/MM integrando o método CPMD com o de dinâmica molecular. Estes cálculos indicaram que o ponto de equilíbrio da benzocaína nos cálculos puramente clássicos, era compatível com o que acontece ao utilizarmos métodos quânticos, porém com uma energia de interação um pouco maior com este último.

O modelo do canal TREK-1 que apresentamos aqui responde aos estímulos observados pelos estudos de experimentalistas, bem como segue a maioria das propostas que fizeram para a forma de modulação desta proteína. O movimento de rotação das α-hélices do canal na abertura do poro é comum em domínios transmembranares e

Rafael C. Bernardi

142

observamos um movimento similar em outro estudo. Ao analisarmos o receptor β -adrenérgico sob a influência de propranolol e noradrenalina, observamos um movimento muito parecido das α -hélices transmembranares desta proteína (anexo 7.6).

Nosso modelo para o mecanismo de modulação do TREK-1 indica que os estímulos, como o estiramento da membrana, o meio intracelular ácido e os anestésicos, aumentam o acoplamento entre a região sensorial do canal e os lipídios da membrana. Este melhor acoplamento faz com que o canal consiga responder melhor aos movimentos da membrana, abrindo o *gate* com maior facilidade. Estes movimentos da membrana são transferidos para a região do poro pela α-hélice do domínio C-terminal e como isto é feito ainda não está muito claro, principalmente devido à falta de tempo de simulação. Uma vez transferido o movimento para hélice M₄, esta se move de forma a girar as demais hélices do canal, em especial a hélice M₂. As hélices M₂ e M₄ possuem um resíduo de leucina cada, que formariam então um *gate* hidrofóbico que se abriria com este movimento giratório. Um modelo que emerge de nossos resultados, para a abertura do TREK-1 sob efeitos físicos ou químicos, está esquematizado abaixo.



Figura 72: Esquema representado o movimento de abertura do canal TREK-1.

Apesar de todos os possíveis problemas com os modelos, acreditamos que nossos cálculos apresentam resultados que nos ajudam a compreender o mecanismo de funcionamento dos canais K_{2P} e um pouco mais sobre efeito anestésico, tanto geral como local. Nosso modelo para este canal de potássio é a primeira caracterização detalhada, em escala atômico-molecular, da interação entre a região C-terminal do TREK-1 e a membrana, mostrando que o mecanismo de modulação destes canais deve estar diretamente relacionado a esta interação. Também é o primeiro trabalho a propor o modelo de *gate*, composto por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, e o movimento de rotação das hélices transmembranares para que haja a abertura e fechamento deste. Temos, porém, em mente que nossos resultados não são totalmente conclusivos e que o conhecimento por completo do mecanismo de funcionamento dos anestésicos em escala atômico-molecular está ainda um pouco distante de ser completo.

6 – PERSPECTIVAS:

Os resultados até agora nos dão um grande indicativo do mecanismo de modulação dos canais K_{2P}, em especial do TREK-1. Porém resultados mais conclusivos poderiam ser obtidos utilizando a membrana com POPC:POPS em todas as simulações, por tempos mais longos, de forma a ter um sistema mais realista. Pretendemos realizar estes cálculos no futuro, bem como os cálculos de uma membrana curvando-se para tentar obter diretamente a abertura do canal durante uma simulação por dinâmica molecular. Além disso, estes cálculos nos deram uma grande experiência para trabalhar com sistemas grandes e complexos que já estamos aplicando a outros sistemas, sendo que alguns deles seguem em anexo.

7 – ANEXOS:

Diversos trabalhos em paralelo foram realizados durante o tempo de realização desta tese. No final deste trabalho encontram-se anexos os artigos publicados ou em desenvolvimento para serem publicados, bem como alguns comentários sobre os demais trabalhos em andamento. Também há um capítulo para uma breve descrição sobre o sistema de computadores que implantamos no Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular e que nos ajudou a realizar boa parte dos cálculos contidos nesta tese.

7.1 – Artigo publicado;

Bernardi, R. C., et al., (2006) – Theoretical Studies on Water-Tetracaine Interaction.

7.2 – Artigo publicado;

Bernardi, R. C., et al., (2007) – Water Solvent and Local Anesthtics: A Computational Study.

7.3 – Artigo publicado;

Bernardi, R. C., et al., (2007) – Density functional and molecular dynamics simulations of local anesthetis in 0.9% NaCl solution.

7.4 – Artigo publicado;

Bernardi, R. C., et al., (2009) – Molecular dynamics study of biomembrane/local anesthetics interactions.

7.5 – Artigo aceito para publicação (Química Nova) – Colaboração com o departamento de física da Universidade Estadual de Londrina;

Gobato, R., et al., (2010) – Estudo da Dinâmica Molecular de Agregação de Benzocaína em Solução Aquosa.

7.6 – Artigo em fase final de preparo – Colaboração com o IQ-UFRJ;

Hoelz, L. V. B., et al. – The β_1 -adrenoceptor activation mechanism.

7.7 – Artigo em fase final de preparo;

Bernardi, R. C., et al. – Study of the free energy profiles of ethanol as drug vehicle for small molecules.

7.8 – Artigo sendo escrito – Colaboração com o Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ;

Mendes, Y. S., et al. – Caracterização Biofísica da interação de peptídeos de fusão de flavivírus com modelos biomiméticos de membrana.

7.9 – Trabalho em andamento – Colaboração com o Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ ;
Estudo de α-hélices polares em membranas biológicas.

7.10 – Trabalho em andamento;

The free-energy profile of a fullerene molecule crossing a bio-membrane.

7.11 – Trabalho em andamento;

Análise das Ligações Intermoleculares em Cadeias de Celulose – Desenvolvimento de uma Possível Ferramenta para Facilitar as Interações Celulase-Substrato.

7.12 - O cluster Jaguatirica;

Recursos Computacionais.

7.13 – Arquivo de parâmetros para MD;

Exemplos de arquivos de parâmetros para cálculos de Dinâmica Molecular utilizando o software GROMACS e NAMD.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Aagaard Thomas H, Kristensen Mette N e Westh Peter Packing properties of 1-alkanols and alkanes in a phospholipid membrane. [Periódico] // Biophys Chem. - 2006. - Vol. 119. - pp. 61-68.

Ahern Christopher A [et al.] Electrostatic contributions of aromatic residues in the local anesthetic receptor of voltage-gated sodium channels. [Periódico] // Circ Res. - 2008. - 1 : Vol. 102. - pp. 86-94.

Alfred, Goodman e Gilman As bases farmacológicas da terapeutica. [Livro] / ed. McGraw-Hill. - [s.l.] : McGraw-Hill, 2003.

Alloui Abdelkrim [et al.] TREK-1, a K+ channel involved in polymodal pain perception. [Periódico] // EMBO J. - 2006. - Vol. 25. - pp. 2368-2376.

Anikin N. A. [et al.] LocalSCF method for semiempirical quantum-chemical calculation of ultralarge biomolecules. [Periódico] // J Chem Phys. - 2004. - Vol. 121. - pp. 1266-1270.

Anisimov V. M., Bugaenko V. L. e Bobrikov V. V. Validation of linear scaling semiempirical LocalSCF method [Periódico] // Journal Of Chemical Theory And Computation. - 2006. - Vol. 2. - pp. 1685-1692.

Aqvist J. e Luzhkov V. Ion permeation mechanism of the potassium channel. [Periódico] // Nature. - 2000. - 6780 : Vol. 404. - pp. 881-884.

Auger M. [et al.] Effects of the local anesthetic tetracaine on the structural and dynamic properties of lipids in model membranes: a high-pressure Fourier transform infrared study. [Periódico] // Biochemistry. - 1988. - Vol. 27. - pp. 6086-6093.

Auger M., Jarrell H. C. e Smith I. C. Interactions of the local anesthetic tetracaine with membranes containing phosphatidylcholine and cholesterol: a 2H NMR study. [Periódico] // Biochemistry. - 1988. - Vol. 27. - pp. 4660-4667.

B Coeli M [et al.] PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K+ channels. [Periódico] // J Physiol. - 2005. - Pt 1 : Vol. 564. - pp. 117-129.

Baker N. A. [et al.] Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome [Periódico] // Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America. - 2001. - Vol. 98. - pp. 10037-10041.

Bako Imre [et al.] Water-methanol mixtures: topology of hydrogen bonded network. [Periódico] // Phys Chem Chem Phys. - 2008. - Vol. 10. - pp. 5004-5011.

Bamdad M. [et al.] A new expression for radial distribution function and infinite shear modulus of Lennard-Jones fluids [Periódico] // Chemical Physics. - 2006. - Vol. 325. - pp. 554-562.

Bayliss Douglas A e Barrett Paula Q Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. [Periódico] // Trends Pharmacol Sci. - 2008.

Becke A. D. Density-Functional Thermochemistry .3. The Role Of Exact Exchange [Periódico] // Journal Of Chemical Physics. - 1993. - Vol. 98. - pp. 5648-5652.

Becke Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. [Periódico] // Phys Rev A. - 1988. - Vol. 38. - pp. 3098-3100.

Bemporad Daniele [et al.] Vstx1, a modifier of Kv channel gating, localizes to the interfacial region of lipid bilayers. [Periódico] // Biochemistry. - 2006. - 39 : Vol. 45. - pp. 11844-11855.

Benz Ryan W [et al.] Experimental validation of molecular dynamics simulations of lipid bilayers: a new approach. [Periódico] // Biophys J. - 2005. - 2 : Vol. 88. - pp. 805-817.

Bernardi R. C. [et al.] Density functional and molecular dynamics simulations of local anesthetics in 0.9% NaCl solution [Periódico] // Molecular Simulation. - [s.l.] : Taylor \& Francis, 2007. - Vol. 33. - pp. 1135-1141.

Bernardi R. C. [et al.] Molecular dynamics study of biomembrane/local anesthetics interactions [Periódico] // Molecular Physics. - [s.l.] : Taylor \& Francis Ltd, 2009. - 14 : Vol. 107. - pp. 1437-1443.

Bernardi R. C. [et al.] Theoretical studies on water-tetracaine interaction [Periódico] // International Journal Of Quantum Chemistry. - 2006. - Vol. 106. - pp. 1277-1282.

Bernardi R. C. [et al.] Water solvent and local anesthetics: A computational study [Periódico] // International Journal Of Quantum Chemistry. - 2007. - Vol. 107. - pp. 1642-1649.

Boulanger Y., Schreier S. e Smith I. C. Molecular details of anesthetic--lipid interaction as seen by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. [Periódico] // Biochemistry. - 1981. - Vol. 20. - pp. 6824-6830.

Breneman C. M. e Wiberg K. B. Determining Atom-Centered Monopoles From Molecular Electrostatic Potentials - The Need For High Sampling Density In Formamide Conformational-Analysis [Periódico] // Journal Of Computational Chemistry. - 1990. - Vol. 11. - pp. 361-373.

Bucher D. [et al.] Polarization effects and charge transfer in the KcsA potassium channel [Periódico] // Biophysical Chemistry. - 2006. - Vol. 124. - pp. 292-301.

Buckingham Steven D [et al.] Structure and function of two-pore-domain K+ channels: contributions from genetic model organisms. [Periódico] // Trends Pharmacol Sci. - 2005. - 7 : Vol. 26. - pp. 361-367.

Butterworth J. F. e Strichartz G. R. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. [Periódico] // Anesthesiology. - 1990. - Vol. 72. - pp. 711-734.

C. H. J. [et al.] Intermolecular Forces [Seção do Livro] / ed. Pullman B. - [s.l.] : Reidel Publishing Company, 1981.

C. H. J. [et al.] Molecular dynamics with coupling to an external bath [Periódico] // The Journal of Chemical Physics. - [s.l.] : AIP, 1984. - Vol. 81. - pp. 3684-3690.

C. H. J., Grigera J. R. e Straatsma T. P. The Missing Term In Effective Pair Potentials [Periódico] // Journal Of Physical Chemistry. - 1987. - Vol. 91. - pp. 6269-6271.

C. H. J., Vanderspoel D. e Vandrunen R. Gromacs - A Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation [Periódico] // Computer Physics Communications. - 1995. - Vol. 91. - pp. 43-56.

C. H. J., Vanderspoel D. e Vandrunen R. Gromacs - A Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation [Periódico] // Computer Physics Communications. - 1995. - Vol. 91. - pp. 43-56.

Cantor R. S. Lateral pressures in cell membranes: A mechanism for modulation of protein function [Periódico] // Journal Of Physical Chemistry B. - 1997. - Vol. 101. - pp. 1723-1725.

Cantor R. S. Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers. [Periódico] // Biophys J. - 1999. - 5 : Vol. 76. - pp. 2625-2639.

Cantor R. S. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. [Periódico] // Biochemistry. - 1997. - Vol. 36. - pp. 2339-2344.

Carley D. D. Computations Of Radial Distribution Functions For A Classical Electron Gas [Periódico] // Physical Review. - 1963. - Vol. 131. - pp. 1406--\&.

Chemin Jean [et al.] A phospholipid sensor controls mechanogating of the K+ channel TREK-1. [Periódico] // EMBO J. - 2005. - Vol. 24. - pp. 44-53.

Chen S. X. e Lostritto R. T. Diffusion of benzocaine in poly(ethylene-vinyl acetate) membranes: Effects of vehicle ethanol concentration and membrane vinyl acetate content [Periódico] // Journal Of Controlled Release. - 1996. - Vol. 38. - pp. 185-191.

Chernoff D. M. e Strichartz G. R. Kinetics of local anesthetic inhibition of neuronal sodium currents. pH and hydrophobicity dependence. [Periódico] // Biophys J. - 1990. - Vol. 58. - pp. 69-81.

Chipot Christophe e Hénin Jérôme Exploring the free-energy landscape of a short peptide using an average force. [Periódico] // J Chem Phys. - 2005. - 24 : Vol. 123. - p. 244906.

Cohen Asi [et al.] A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. [Periódico] // J Biol Chem. - 2008. - Vol. 283. - pp. 19448-19455.

Cukier Robert I How many atoms are required to characterize accurately trajectory fluctuations of a protein? [Periódico] // J Chem Phys. - 2010. - Vol. 132. - p. 245101.

D. S. T. [et al.] Entropy calculation of HIV-1 env gp120, its receptor CD4, and their complex: An analysis of configurational entropy changes upon complexation [Periódico] // Biophysical Journal. - 2005. - Vol. 88. - pp. 15-24.

Dallas Mark L, Scragg Jason L e Peers Chris Modulation of hTREK-1 by carbon monoxide. [Periódico] // Neuroreport. - 2008. - Vol. 19. - pp. 345-348.

Daniels A. D. e Scuseria G. E. What is the best alternative to diagonalization of the Hamiltonian in large scale semiempirical calculations? [Periódico] // Journal Of Chemical Physics. - 1999. - Vol. 110. - pp. 1321-1328.

Darden T., York D. e Pedersen L. Particle Mesh Ewald - An N.Log(N) Method For Ewald Sums In Large Systems [Periódico] // Journal Of Chemical Physics. - 1993. - Vol. 98. - pp. 10089-10092.

Darve E. e Pohorille A. Calculating free energies using average force [Periódico] // Journal Of Chemical Physics. - 2001. - 20 : Vol. 115. - pp. 9169-9183.

de M. D. [et al.] GSA algorithm applied to electronic structure II: UHF-GSA method [Periódico] // International Journal Of Quantum Chemistry. - 2006. - Vol. 106. - pp. 2700-2705.

de M. D., Mundim K. C. e C. L. A. GSA algorithm applied to electronic structure: Hartree-Fock-GSA method [Periódico] // International Journal Of Quantum Chemistry. - 2005. - Vol. 103. - pp. 493-499.

Dedman Alexandra [et al.] The mechano-gated K(2P) channel TREK-1. [Periódico] // Eur Biophys J. - 2008.

den Els van [et al.] Small alcohols destabilize the KcsA tetramer via their effect on the membrane lateral pressure. [Periódico] // Biochemistry. - 2004. - Vol. 43. - pp. 5937-5942.

Der D Van [et al.] GROMACS: fast, flexible, and free [Periódico] // J Comput Chem. - 2005. - Vol. 26. - pp. 1701-1718.

Dickey Allison N e Faller Roland How alcohol chain-length and concentration modulate hydrogen bond formation in a lipid bilayer. [Periódico] // Biophys J. - 2007. - Vol. 92. - pp. 2366-2376.

Dickey AN e Faller R {Investigating interactions of biomembranes and alcohols: A multiscale approach} [Periódico] // {JOURNAL OF POLYMER SCIENCE PART B-POLYMER PHYSICS}. - {2005}. - Vol. {43}. - pp. {1025-1032}.

Dickinson Robert [et al.] Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology. [Periódico] // Anesthesiology. - 2007. - 5 : Vol. 107. - pp. 756-767.

Doyle D. A. [et al.] The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity. [Periódico] // Science. - 1998. - 5360 : Vol. 280. - pp. 69-77.

Elliott J. R., Haydon D. A. e Hendry B. M. The mechanisms of sodium current inhibition by benzocaine in the squid giant axon. [Periódico] // Pflugers Arch. - 1987. - Vol. 409. - pp. 596-600.

Elmore D. E. Molecular dynamics simulation of a phosphatidylglycerol membrane [Periódico] // Febs Letters. - 2006. - Vol. 580. - pp. 144-148.

Ensing B. [et al.] Energy conservation in adaptive hybrid atomistic/coarse-grain molecular dynamics [Periódico] // Journal Of Chemical Theory And Computation. - 2007. - Vol. 3. - pp. 1100-1105.

Enyeart John J [et al.] Angiotensin II inhibits bTREK-1 K+ channels in adrenocortical cells by separate Ca2+and ATP hydrolysis-dependent mechanisms. [Periódico] // J Biol Chem. - 2005. - Vol. 280. - pp. 30814-30828.

Eslami Hossein [et al.] Molecular dynamics simulation of confined fluids in isosurface-isothermal-isobaric ensemble. [Periódico] // J Chem Phys. - 2008. - 19 : Vol. 129. - p. 194702.

Esteban-Martín Santi e Salgado Jesús Self-assembling of peptide/membrane complexes by atomistic molecular dynamics simulations. [Periódico] // Biophys J. - 2007. - Vol. 92. - pp. 903-912.

Feller S. E. e Pastor R. W. Constant surface tension simulations of lipid bilayers: The sensitivity of surface areas and compressibilities [Periódico] // Journal Of Chemical Physics. - 1999. - 3 : Vol. 111. - pp. 1281-1287.

Feller Scott E [et al.] Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy cross-relaxation rates and ethanol distribution across membranes. [Periódico] // Biophys J. - 2002. - Vol. 82. - pp. 1396-1404.

Filipponi A. The Radial-Distribution Function Probed By X-Ray-Absorption Spectroscopy [Periódico] // Journal Of Physics-Condensed Matter. - 1994. - Vol. 6. - pp. 8415-8427.

Floquet Nicolas [et al.] Collective motions in glucosamine-6-phosphate synthase: influence of ligand binding and role in ammonia channelling and opening of the fructose-6-phosphate binding site. [Periódico] // J Mol Biol. - 2009. - Vol. 385. - pp. 653-664.

Fozzard H. A., Lee P. J. e Lipkind G. M. Mechanism of local anesthetic drug action on voltage-gated sodium channels. [Periódico] // Curr Pharm Des. - 2005. - Vol. 11. - pp. 2671-2686.

Fraceto Leonardo F [et al.] Interaction of local anesthetics with a peptide encompassing the IV/S4-S5 linker of the Na+ channel. [Periódico] // Biophys Chem. - 2006. - Vol. 123. - pp. 29-39.

Frazier D. T., Narahashi T. e Yamada M. The site of action and active form of local anesthetics. II. Experiments with quaternary compounds. [Periódico] // J Pharmacol Exp Ther. - 1970. - Vol. 171. - pp. 45-51.

Frisch M. J. [et al.] Gaussian 03, \uppercase{R}evision \uppercase{B}.04 // Gaussian 03, \uppercase{R}evision \uppercase{B}.04 . - 2004. - \uppercase{G}aussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.

Frischknecht Amalie L e Douglas Laura J Alcohols reduce lateral membrane pressures: predictions from molecular theory. [Periódico] // Biophys J. - 2006. - Vol. 91. - pp. 4081-4090.

Gadsby David C Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. [Periódico] // Nat Rev Mol Cell Biol. - 2009. - 5 : Vol. 10. - pp. 344-352.

Gobato R. [et al.] Molecular dynamics study of benzocaine aggregation in water solution. [Periódico] // Biophysical Chemistry. - 2008. - Vols. submetido - 08fev.2008.

Goldstein S. A. [et al.] Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. [Periódico] // Nat Rev Neurosci. - 2001. - 3 : Vol. 2. - pp. 175-184.

Gorfe Alemayehu A, Baron Riccardo e McCammon J. Andrew Water-membrane partition thermodynamics of an amphiphilic lipopeptide: an enthalpy-driven hydrophobic effect. [Periódico] // Biophys J. - 2008. - 7 : Vol. 95. - pp. 3269-3277.

Grasshoff Christian [et al.] Anaesthetic drugs: linking molecular actions to clinical effects. [Periódico] // Curr Pharm Des. - 2006. - Vol. 12. - pp. 3665-3679.

Gullingsrud Justin e Schulten Klaus Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. [Periódico] // Biophys J. - 2004. - 6 : Vol. 86. - pp. 3496-3509.

Gupta Ashish, Chauhan Anuj e Kopelevich Dmitry I Molecular modeling of surfactant covered oil-water interfaces: Dynamics, microstructure, and barrier for mass transport. [Periódico] // J Chem Phys. - 2008. - 23 : Vol. 128. - p. 234709.

Harinath S. e Sikdar S. K. Inhibition of human TREK-1 channels by caffeine and theophylline. [Periódico] // Epilepsy Res. - 2005. - Vol. 64. - pp. 127-135.

Hemmings Hugh C [et al.] Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. [Periódico] // Trends Pharmacol Sci. - 2005. - 10 : Vol. 26. - pp. 503-510.

Hénin Jérôme e Chipot Christophe Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations. [Periódico] // J Chem Phys. - 2004. - 7 : Vol. 121. - pp. 2904-2914.

Hess B. [et al.] LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations [Periódico] // Journal Of Computational Chemistry. - 1997. - Vol. 18. - pp. 1463-1472.

Hille B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. [Periódico] // J Gen Physiol. - 1977. - Vol. 69. - pp. 497-515.

Hogberg Carl-Johan e Lyubartsev Alexander P. Effect of Local Anesthetic Lidocaine on Electrostatic Properties of a Lipid Bilayer [Periódico] // Biophys. J.. - 2008. - Vol. 94. - pp. 525-531.

Högberg Carl-Johan, Maliniak Arnold e Lyubartsev Alexander P Dynamical and structural properties of charged and uncharged lidocaine in a lipid bilayer. [Periódico] // Biophys Chem. - 2007. - Vol. 125. - pp. 416-424.

Hohenberg P. e Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas [Periódico] // Physical Review B. - 1964. - Vol. 136. - pp. B864--\&.

Honoré Eric The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. [Periódico] // Nat Rev Neurosci. - 2007. - 4 : Vol. 8. - pp. 251-261.

Huang D. M. e Chandler D. The hydrophobic effect and the influence of solute-solvent attractions [Periódico] // Journal Of Physical Chemistry B. - 2002. - Vol. 106. - pp. 2047-2053.

Hughes Steven [et al.] Selective activation of mechanosensitive ion channels using magnetic particles. [Periódico] // J R Soc Interface. - 2008. - 25 : Vol. 5. - pp. 855-863.

Jiang Youxing [et al.] The open pore conformation of potassium channels. [Periódico] // Nature. - 2002. - 6888 : Vol. 417. - pp. 523-526.

Johansson Jonas S Noninactivating tandem pore domain potassium channels as attractive targets for general anesthetics. [Periódico] // Anesth Analg. - 2003. - 5 : Vol. 96. - pp. 1248-1250.

Jørgensen K. [et al.] Dynamical and structural properties of lipid membranes in relation to liposomal drug delivery systems. [Periódico] // Cell Mol Biol Lett. - 2001. - Vol. 6. - pp. 255-263.

Kandt C., Ash W. L. e Tieleman D. P. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins [Periódico] // Methods. - 2007. - Vol. 41. - pp. 475-488.

Kennard Louise E [et al.] Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. [Periódico] // Br J Pharmacol. - 2005. - Vol. 144. - pp. 821-829.

Keshavaprasad Bharat [et al.] Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TRESK. [Periódico] // Anesth Analg. - 2005. - 4 : Vol. 101. - pp. 1042--9, table of contents.

Khalili-Araghi F. [et al.] Molecular dynamics simulations of membrane channels and transporters [Periódico] // Current Opinion In Structural Biology. - 2009. - Vol. 19. - pp. 128-137.

Kim Donghee Physiology and pharmacology of two-pore domain potassium channels. [Periódico] // Curr Pharm Des. - 2005. - 21 : Vol. 11. - pp. 2717-2736.

Kim Y. [et al.] Localization of TREK-2 K+ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pHi. [Periódico] // Pflugers Arch. - 2001. - 6 : Vol. 442. - pp. 952-960.

Kindler Christoph H e Yost C. Spencer Two-pore domain potassium channels: new sites of local anesthetic action and toxicity. [Periódico] // Reg Anesth Pain Med. - 2005. - 3 : Vol. 30. - pp. 260-274.

Kitagawa Norihito, Oda Mayuko e Totoki Tadahide Possible mechanism of irreversible nerve injury caused by local anesthetics: detergent properties of local anesthetics and membrane disruption. [Periódico] // Anesthesiology. - 2004. - Vol. 100. - pp. 962-967.

Klein Michael L e Shinoda Wataru Large-scale molecular dynamics simulations of self-assembling systems. [Periódico] // Science. - 2008. - 5890 : Vol. 321. - pp. 798-800.

Klemm W. R. Biological water and its role in the effects of alcohol. [Periódico] // Alcohol. - 1998. - Vol. 15. - pp. 249-267.

Knecht V. e Marrink S. J. Molecular dynamics simulations of lipid vesicle fusion in atomic detail [Periódico] // Biophysical Journal. - 2007. - Vol. 92. - pp. 4254-4261.

Kohn W. e Sham L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange And Correlation Effects [Periódico] // Physical Review. - 1965. - Vol. 140. - pp. 1133--\&.

Korolkovas A. e Burkhalter J. H. Química Farmaceutica. [Livro] / ed. Koogan. Guanabara. - [s.l.] : Guanabara Koogan., 1988.

Korolkovas, J. H. Química Faramacêutica [Livro]. - [s.l.] : Ed. Guanabara, 1982.

Kraszewski Sebastian [et al.] Affinity of C(60) Neat Fullerenes with Membrane Proteins: A Computational Study on Potassium Channels. [Periódico] // ACS Nano. - 2010.

Kyrychenko Alexander e Dyubko Tatyana S Molecular dynamics simulations of microstructure and mixing dynamics of cryoprotective solvents in water and in the presence of a lipid membrane. [Periódico] // Biophys Chem. - 2008. - Vol. 136. - pp. 23-31.

La Jun-Ho [et al.] A novel acid-sensitive K+ channel in rat dorsal root ganglia neurons. [Periódico] // Neurosci Lett. - 2006. - 3 : Vol. 406. - pp. 244-249.

Lee A. G. Model for action of local anaesthetics. [Periódico] // Nature. - 1976. - 5569 : Vol. 262. - pp. 545-548.

Lee C. T., Yang W. T. e Parr R. G. Development Of The Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula Into A Functional Of The Electron-Density [Periódico] // Physical Review B. - 1988. - Vol. 37. - pp. 785-789.

Lee Philip J [et al.] Evaluation of chemical enhancers in the transdermal delivery of lidocaine. [Periódico] // Int J Pharm. - 2006. - Vol. 308. - pp. 33-39.

Lee Seok-Yong e MacKinnon Roderick A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom. [Periódico] // Nature. - 2004. - 6996 : Vol. 430. - pp. 232-235.

Lelièvre Tony, Rousset Mathias e Stoltz Gabriel Computation of free energy profiles with parallel adaptive dynamics. [Periódico] // J Chem Phys. - 2007. - 13 : Vol. 126. - p. 134111.

Leonenko Z. V. e Cramb D. T. Revisiting lipid - general anesthetic interactions (I): Thinned domain formation in supported planar bilayers induced by halothane and ethanol [Periódico] // Canadian Journal Of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie. - 2004. - Vol. 82. - pp. 1128-1138.

Lesage F. [et al.] Dimerization of TWIK-1 K+ channel subunits via a disulfide bridge. [Periódico] // EMBO J. - 1996. - 23 : Vol. 15. - pp. 6400-6407.

Levine Ira Quantum Chemistry [Livro] / ed. Education Pearson. - [s.l.] : Pearson Education, 2003.

Li Hui, Robertson Andrew D e Jensen Jan H Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. [Periódico] // Proteins. - 2005. - Vol. 61. - pp. 704-721.

Lindahl E. e P. M. S. Membrane proteins: molecular dynamics simulations [Periódico] // Current Opinion In Structural Biology. - 2008. - Vol. 18. - pp. 425-431.

Lindahl E., Hess B. e der D. van GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis [Periódico] // Journal Of Molecular Modeling. - 2001. - Vol. 7. - pp. 306-317.

Lins Roberto D [et al.] Computer simulation of uranyl uptake by the rough lipopolysaccharide membrane of Pseudomonas aeruginosa. [Periódico] // Biomacromolecules. - 2008. - 1 : Vol. 9. - pp. 29-35.

Lipkind Gregory M e Fozzard Harry A Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. [Periódico] // Mol Pharmacol. - 2005. - Vol. 68. - pp. 1611-1622.

List G. R. [et al.] Triacylglycerol structure and composition of hydrogenated soybean oil margarine and shortening basestocks [Periódico] // Journal Of Agricultural And Food Chemistry. - 2005. - Vol. 53. - pp. 4692-4695.

Liu P., Kurihara-Bergstrom T. e Good W. R. Cotransport of estradiol and ethanol through human skin in vitro: understanding the permeant/enhancer flux relationship. [Periódico] // Pharm Res. - 1991. - Vol. 8. - pp. 938-944.

Lundbaek J. A. [et al.] Membrane stiffness and channel function [Periódico] // Biochemistry. - 1996. - Vol. 35. - pp. 3825-3830.

Ly Hung V e Longo Marjorie L The influence of short-chain alcohols on interfacial tension, mechanical properties, area/molecule, and permeability of fluid lipid bilayers. [Periódico] // Biophys J. - 2004. - Vol. 87. - pp. 1013-1033.

Lyubartsev A. P. e Laaksonen A. Calculation Of Effective Interaction Potentials From Radial-Distribution Functions - A Reverse Monte-Carlo Approach [Periódico] // Physical Review E. - 1995. - Vol. 52. - pp. 3730-3737.

Maingret F. [et al.] Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. [Periódico] // J Biol Chem. - 2000. - 14 : Vol. 275. - pp. 10128-10133.

Maingret François [et al.] Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K(+) channel. [Periódico] // Biochem Biophys Res Commun. - 2002. - 2 : Vol. 292. - pp. 339-346.

Marrink S. J. [et al.] Membranes and water: An interesting relationship [Periódico] // Faraday Discussions. - 1996. - Vol. 103. - pp. 191-201.

Maruyama Yoshiaki e Yamada Mitsuhiko [TREK-1: a potential target for novel antidepressants] [Periódico] // Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. - 2007. - Vol. 27. - pp. 147-151.

McCormick K. A. [et al.] Molecular determinants of Na+ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. [Periódico] // J Biol Chem. - 1998. - Vol. 273. - pp. 3954-3962.

McNulty Megan M [et al.] Charge at the lidocaine binding site residue Phe-1759 affects permeation in human cardiac voltage-gated sodium channels. [Periódico] // J Physiol. - 2007. - Pt 2 : Vol. 581. - pp. 741-755.

Melo Francisco, Sánchez Roberto e Sali Andrej Statistical potentials for fold assessment. [Periódico] // Protein Sci. - 2002. - Vol. 11. - pp. 430-448.

Migliore A. [et al.] First-principles density-functional theory calculations of electron-transfer rates in azurin dimers. [Periódico] // J Chem Phys. - 2006. - 6 : Vol. 124. - p. 64501.

Miyamoto S. e Kollman P. A. Settle - An Analytical Version Of The Shake And Rattle Algorithm For Rigid Water Models [Periódico] // Journal Of Computational Chemistry. - 1992. - Vol. 13. - pp. 952-962.

Mundim K. C. An analytical procedure to evaluate electronic integrals for molecular quantum mechanical calculations [Periódico] // Physica A-Statistical Mechanics And Its Applications. - 2005. - Vol. 350. - pp. 338-348.

Mundim Kleber C. Anais da IV Escola do CBPF. [Livro] / ed. CBPF. - [s.l.] : CBPF, 2002.

N Steve A [et al.] International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. [Periódico] // Pharmacol Rev. - 2005. - 4 : Vol. 57. - pp. 527-540.

Narahashi T., Frazier T. e Yamada M. The site of action and active form of local anesthetics. I. Theory and pH experiments with tertiary compounds. [Periódico] // J Pharmacol Exp Ther. - 1970. - Vol. 171. - pp. 32-44.

Narahashi T., Yamada M. e Frazier D. T. Cationic forms of local anaesthetics block action potentials from inside the nerve membrane. [Periódico] // Nature. - 1969. - Vol. 223. - pp. 748-749.

Nose S. e Klein M. L. Constant Pressure Molecular-Dynamics For Molecular-Systems [Periódico] // Molecular Physics. - 1983. - 5 : Vol. 50. - pp. 1055-1076.

Noskov Sergei Yu e Roux Benoît Ion selectivity in potassium channels. [Periódico] // Biophys Chem. - 2006. - 3 : Vol. 124. - pp. 279-291.

Ogata S. [et al.] Scalable and portable implementation of the fast multipole method on parallel computers [Periódico] // Computer Physics Communications. - 2003. - Vol. 153. - pp. 445-461.

Onsager Lars Electric Moments of Molecules in Liquids [Periódico] // J. Am. Chem. Soc. - 1936. - Vol. 58(8). - pp. 1486-1493.

Onsager Lars Electric Moments of Molecules in Liquids [Periódico] // J. Am. Chem. Soc. - 1936. - Vol. 58(8). - pp. 1486-1493.

Papoian Garegin A, DeGrado William F e Klein Michael L Probing the configurational space of a metalloprotein core: an ab initio molecular dynamics study of Duo Ferro 1 binuclear Zn cofactor. [Periódico] // J Am Chem Soc. - 2003. - Vol. 125. - pp. 560-569.

Parrill A. L. Structural characteristics of lysophosphatidic acid biological targets. [Periódico] // Biochem Soc Trans. - 2005. - Pt 6 : Vol. 33. - pp. 1366-1369.

Parrinello M. e Rahman A. Polymorphic Transitions In Single-Crystals - A New Molecular-Dynamics Method [Periódico] // Journal Of Applied Physics. - 1981. - 12 : Vol. 52. - pp. 7182-7190.

Pasenkiewicz-Gierula M. [et al.] Effects of a carane derivative local anesthetic on a phospholipid bilayer studied by molecular dynamics simulation. [Periódico] // Biophys J. - 2003. - Vol. 85. - pp. 1248-1258.

Patel A. J. [et al.] A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K+ channel. [Periódico] // EMBO J. - 1998. - 15 : Vol. 17. - pp. 4283-4290.

Patel A. J. [et al.] Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K+ channels. [Periódico] // Nat Neurosci. - 1999. - 5 : Vol. 2. - pp. 422-426.

Patra M. [et al.] Lipid bilayers driven to a wrong lane in molecular dynamics simulations by subtle changes in long-range electrostatic interactions [Periódico] // Journal Of Physical Chemistry B. - 2004. - 14 : Vol. 108. - pp. 4485-4494.

Patra Michael [et al.] Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. [Periódico] // Biophys J. - 2006. - Vol. 90. - pp. 1121-1135.

Pedersen Ulf R, Peters Günther H e Westh Peter Molecular packing in 1-hexanol-DMPC bilayers studied by molecular dynamics simulation. [Periódico] // Biophys Chem. - 2007. - Vol. 125. - pp. 104-111.

Peraro Matteo Dal [et al.] Investigating biological systems using first principles Car-Parrinello molecular dynamics simulations. [Periódico] // Curr Opin Struct Biol. - 2007. - Vol. 17. - pp. 149-156.

Pereira Cristina S [et al.] Interaction of the disaccharide trehalose with a phospholipid bilayer: a molecular dynamics study. [Periódico] // Biophys J. - 2004. - Vol. 86. - pp. 2273-2285.

Perozo Eduardo [et al.] Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. [Periódico] // Nat Struct Biol. - 2002. - 9 : Vol. 9. - pp. 696-703.

Petersson G. A. [et al.] A Complete Basis Set Model Chemistry .1. The Total Energies Of Closed-Shell Atoms And Hydrides Of The 1st-Row Elements [Periódico] // Journal Of Chemical Physics. - 1988. - Vol. 89. - pp. 2193-2218.

Petersson G. A. e Allaham M. A. A Complete Basis Set Model Chemistry .2. Open-Shell Systems And The Total Energies Of The 1st-Row Atoms [Periódico] // Journal Of Chemical Physics. - 1991. - Vol. 94. - pp. 6081-6090.

Pinto L. M. [et al.] Interaction of benzocaine with model membranes. [Periódico] // Biophys Chem. - 2000. - Vol. 87. - pp. 213-223.

Popper Paul [et al.] Distribution of two-pore-domain potassium channels in the adult rat vestibular periphery. [Periódico] // Hear Res. - 2008.

Punke Mark A [et al.] Inhibition of human TREK-1 channels by bupivacaine. [Periódico] // Anesth Analg. - 2003. - 6 : Vol. 96. - pp. 1665--73, table of contents.

Ragsdale D. S. [et al.] Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na+ channels. [Periódico] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1996. - Vol. 93. - pp. 9270-9275.

Ragsdale D. S. [et al.] Molecular Determinants Of State-Dependent Block Of Na+ Channels By Local-Anesthetics [Periódico] // Science. - 1994. - Vol. 265. - pp. 1724-1728.

Richardson J. M. Variational Theory Of The Radial Distribution Function [Periódico] // Journal Of Chemical Physics. - 1955. - Vol. 23. - pp. 2304-2308.

Rodriguez-Gomez David, Darve Eric e Pohorille Andrew Assessing the efficiency of free energy calculation methods. [Periódico] // J Chem Phys. - 2004. - 8 : Vol. 120. - pp. 3563-3578.

Rowe E. S. [et al.] Thermodynamics of membrane partitioning for a series of n-alcohols determined by titration calorimetry: role of hydrophobic effects. [Periódico] // Biochemistry. - 1998. - Vol. 37. - pp. 2430-2440.

Ruetsch Y. A., Böni T. e Borgeat A. From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. [Periódico] // Curr Top Med Chem. - 2001. - Vol. 1. - pp. 175-182.

Ryckaert J. P., Ciccotti G. e C. H. J. Numerical-Integration Of Cartesian Equations Of Motion Of A System With Constraints - Molecular-Dynamics Of N-Alkanes [Periódico] // Journal Of Computational Physics. - 1977. - Vol. 23. - pp. 327-341.

Sachs J. N., Tieleman D. P. e Engelman D. M. Effects of membrane proteins on bilayer structural and material properties studied by all-atom molecular dynamics simulations [Periódico] // Biophysical Journal. - 2007. - pp. 424A--424A.

Saiz L. e Klein M. L. The transmembrane domain of the acetylcholine receptor: Insights from simulations on synthetic peptide models [Periódico] // Biophysical Journal. - 2005. - Vol. 88. - pp. 959-970.

Sammalkorpi Maria, Karttunen Mikko e Haataja Mikko Structural properties of ionic detergent aggregates: a large-scale molecular dynamics study of sodium dodecyl sulfate. [Periódico] // J Phys Chem B. - 2007. - Vol. 111. - pp. 11722-11733.

Scheuer T. Commentary: A revised view of local anesthetic action: what channel state is really stabilized? [Periódico] // J Gen Physiol. - 1999. - 1 : Vol. 113. - pp. 3-6.

Scott W.R.P. [et al.] The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package [Periódico] // Journal of Physical Chemistry A. - 1999. - Vol. 103. - pp. 3596-3607.

Seeman P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. [Periódico] // Pharmacol Rev. - 1972. - Vol. 24. - pp. 583-655.

Sharma Ramesh R e Chellam Shankararaman Temperature and concentration effects on electrolyte transport across porous thin-film composite nanofiltration membranes: Pore transport mechanisms and energetics of permeation. [Periódico] // J Colloid Interface Sci. - 2006. - 1 : Vol. 298. - pp. 327-340.

Shen Min-Yi e Sali Andrej Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. [Periódico] // Protein Sci. - 2006. - Vol. 15. - pp. 2507-2524.

Shen R., Guo W. e Zhong W. Dynamic hydration valve controlled ion permeability and stability of NaK channel [Periódico] // Nature Precedings. - 2008.

Sherwood Paul, Brooks Bernard R e P Mark S Multiscale methods for macromolecular simulations. [Periódico] // Curr Opin Struct Biol. - 2008. - Vol. 18. - pp. 630-640.

Shi Ning [et al.] Atomic structure of a Na+- and K+-conducting channel. [Periódico] // Nature. - 2006. - 7083 : Vol. 440. - pp. 570-574.

Shibata A., Ikawa K. e Terada H. Site of action of the local anesthetic tetracaine in a phosphatidylcholine bilayer with incorporated cardiolipin. [Periódico] // Biophys J. - 1995. - Vol. 69. - pp. 470-477.

Simonsen Anne [et al.] The role of phosphoinositides in membrane transport [Periódico] // Current Opinion in Cell Biology. - 2001. - 4 : Vol. 13. - pp. 485-492.

Sirota Fernanda L, Pascutti Pedro G e Anteneodo Celia Molecular modeling and dynamics of the sodium channel inactivation gate. [Periódico] // Biophys J. - 2002. - Vol. 82. - pp. 1207-1215.

Sit P. H-L, Cococcioni Matteo e Marzari Nicola Realistic quantitative descriptions of electron transfer reactions: diabatic free-energy surfaces from first-principles molecular dynamics. [Periódico] // Phys Rev Lett. - 2006. - 2 : Vol. 97. - p. 028303.

Sotomayor Marcos e Schulten Klaus Molecular dynamics study of gating in the mechanosensitive channel of small conductance MscS. [Periódico] // Biophys J. - 2004. - 5 : Vol. 87. - pp. 3050-3065.

Sotomayor Marcos e Schulten Klaus Single-molecule experiments in vitro and in silico. [Periódico] // Science. - 2007. - 5828 : Vol. 316. - pp. 1144-1148.

Strugala G. J., Elsenhans B. e Forth W. Active transport inhibition in rat small intestine by amphiphilic amines: An in vitro study with various local anaesthetics [Periódico] // Biochemical Pharmacology. - 2000. - Vol. 59. - pp. 907-913.

Terama Emma [et al.] Influence of ethanol on lipid membranes: from lateral pressure profiles to dynamics and partitioning. [Periódico] // J Phys Chem B. - 2008. - Vol. 112. - pp. 4131-4139.

Terrenoire C. [et al.] A TREK-1-like potassium channel in atrial cells inhibited by beta-adrenergic stimulation and activated by volatile anesthetics. [Periódico] // Circ Res. - 2001. - 4 : Vol. 89. - pp. 336-342.

Tieleman D. P. e C. H. J. Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters [Periódico] // Journal Of Chemical Physics. - 1996. - Vol. 105. - pp. 4871-4880.

Tieleman D. Peter [et al.] Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields. [Periódico] // J Am Chem Soc. - 2003. - 21 : Vol. 125. - pp. 6382-6383.

Treptow Werner [et al.] Coupled motions between pore and voltage-sensor domains: a model for Shaker B, a voltage-gated potassium channel. [Periódico] // Biophys J. - 2004. - 4 : Vol. 87. - pp. 2365-2379.

Treptow Werner e Klein Michael L The membrane-bound state of K2P potassium channels. [Periódico] // J Am Chem Soc. - 2010. - 23 : Vol. 132. - pp. 8145-8151.

Treptow Werner e Tarek Mounir Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. [Periódico] // Biophys J. - 2006. - 9 : Vol. 90. - pp. L64--L66.

Treptow Werner e Tarek Mounir K+ conduction in the selectivity filter of potassium channels is monitored by the charge distribution along their sequence. [Periódico] // Biophys J. - 2006. - 10 : Vol. 91. - pp. L81--L83.

Treptow Werner e Tarek Mounir Molecular restraints in the permeation pathway of ion channels. [Periódico] // Biophys J. - 2006. - 3 : Vol. 91. - pp. L26--L28.

Treptow Werner L [et al.] Non-native interactions, effective contact order, and protein folding: a mutational investigation with the energetically frustrated hydrophobic model. [Periódico] // Proteins. - 2002. - 2 : Vol. 49. - pp. 167-180.

Treptow Werner, Marrink Siewert-J. e Tarek Mounir Gating motions in voltage-gated potassium channels revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations. [Periódico] // J Phys Chem B. - 2008. - 11 : Vol. 112. - pp. 3277-3282.

Treptow Werner, Tarek Mounir e Klein Michael L Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. [Periódico] // J Am Chem Soc. - 2009. - 6 : Vol. 131. - pp. 2107-2109.

Ueta Kazuyoshi [et al.] Local anesthetics have different mechanisms and sites of action at recombinant 5-HT3 receptors. [Periódico] // Reg Anesth Pain Med. - 2007. - Vol. 32. - pp. 462-470.

van W. F. e Berendsen H. J. Computer simulation as a tool for tracing the conformational differences between proteins in solution and in the crystalline state. [Periódico] // J Mol Biol. - 1984. - 4 : Vol. 176. - pp. 559-564.

Vemparala Satyavani [et al.] Partitioning of anesthetics into a lipid bilayer and their interaction with membranebound peptide bundles. [Periódico] // Biophys J. - 2006. - Vol. 91. - pp. 2815-2825.

Voet Donald, Voet Judith G. e Pratt Charlotte W. Fundamentos de Bioquímica [Livro] / ed. ARTMED. - [s.l.] : ARTMED, 2002.

Voloshyna Iryna [et al.] TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer. [Periódico] // Cancer Res. - 2008. - Vol. 68. - pp. 1197-1203.

Vora Taira, Bisset David e Chung Shin-Ho Conduction of Na+ and K+ through the NaK channel: molecular and Brownian dynamics studies. [Periódico] // Biophys J. - 2008. - 4 : Vol. 95. - pp. 1600-1611.

Wang D. M. [et al.] Permeation of drug and swelling agent through polymeric membranes [Periódico] // Aiche Journal. - 2000. - Vol. 46. - pp. 2383-2394.

Wang G. K., Quan C. e Wang S. A common local anesthetic receptor for benzocaine and etidocaine in voltagegated mu1 Na+ channels. [Periódico] // Pflugers Arch. - 1998. - Vol. 435. - pp. 293-302.

Wang G. K., Quan C. e Wang S. Y. Local anesthetic block of batrachotoxin-resistant muscle Na+ channels [Periódico] // Molecular Pharmacology. - 1998. - Vol. 54. - pp. 389-396.

Wang Sho-Ya [et al.] Serine-401 as a batrachotoxin- and local anesthetic-sensing residue in the human cardiac Na+ channel. [Periódico] // Pflugers Arch. - 2007. - 2 : Vol. 454. - pp. 277-287.

Wee Chze Ling [et al.] SGTx1, a Kv channel gating-modifier toxin, binds to the interfacial region of lipid bilayers. [Periódico] // Biophys J. - 2007. - 1 : Vol. 92. - pp. L07--L09.

Wee Chze Ling, Gavaghan David e P Mark S Interactions between a voltage sensor and a toxin via multiscale simulations. [Periódico] // Biophys J. - 2010. - 8 : Vol. 98. - pp. 1558-1565.

Wu Xu [et al.] Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. [Periódico] // J Am Chem Soc. - 2004. - Vol. 126. - pp. 1590-1591.

Zhang Jingzhong [et al.] Tetracaine-membrane interactions: effects of lipid composition and phase on drug partitioning, location, and ionization. [Periódico] // Biophys J. - 2007. - Vol. 92. - pp. 3988-4001.

ANEXOS
ANEXO 7.1 – ARTIGO PUBLICADO (BERNARDI ET AL. 2006):



Key words: density functional theory; molecular dynamics; radial distribution function; local anesthetics; hydrophobicity

Correspondence to: A. T. Ota; e-mail: isuiomu@uel.br Contract grant sponsors: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Conseiho Nacional de Pesquisas (CNPq), Fundação Araucária de Apolo Científico e Tecnológico do Estado do Paraná.

International Journal of Quantum Chemistry, Vol 106, 1277–1282 (2006) © 2005 Wiley Periodicals, Inc.



FIGURE 1. Schematic representation of tetracaine in the protonated form, corresponding to the minimal energy structure obtained from DFT calculations. In the unprotonated form, the atom 25 is absent. Region I of TTC is the aliphatic group, containing atoms C24–C21. Region II is the aromatic ring plus the secondary amine, corresponding to atoms C02–H13. Region III is the ester group, from atoms C01–C16. Region IV is the terminal tertiary amine, ranging from atoms C17–H25.

Introduction

The action of anesthetics of local use (LA) has been the object of several experimental studies. The dominant hypothesis is that in the unprotonated form LA crosses the interface of membranes, while the protonated form anchors in the membranes surface. The hypothesis came from the study of physicochemical and pharmacological properties of the molecules, such as their electronegativity, pK_a value, and data from electron paramagnetic resonance (EPR) experiments [1–4]. Detailed structural information about LA is not available from crystallography, mainly because of the difficulty in obtaining crystals of the material using conventional techniques.

Among several LA, tetracaine (TTC) (Fig. 1) is the subject of our attention. TTC is an amino ester unstable in water solution; thus, it is difficult for its structure to be well understood. The molecule has an ester group linking an amino group to an aromatic lipophilic ring. Variation on the amino or aromatic groups changes the chemical activity of the drug. The aromatic ring is soluble in lipids, and this should be important for the penetration of the anesthetic molecule through the lipid bilayer of the nerve cell membrane. In contrast, the amino group is water soluble, making possible to dissolve the molecule in the cellular aqueous environment, allowing TTC to remain in solution on either side of

1278

the nerve membrane. The role played by the anesthetic molecule is related to its distribution on both sides of the cell membrane, and this should be dependent on its protonation state. The pK_a of TTC is >8.5 [5], indicating that in the physiological environment the concentration of the protonated form is higher than that of the unprotonated form. When the pH decreases the anesthetic action diminish, indicating that the unprotonated form should be preferential to its physiological activity.

In any given solution of anesthetic, the molecular structure shifts between two forms that exists in an equilibrium dependent on the exact pH of the solution. In the present work, we examine the structural characteristics of TTC in different protonation states, obtained from calculations using the density functional theory (DFT) method. The results from quantum mechanical calculations were used to perform molecular dynamics (MD) simulations of TTC in the presence of water solvent molecules. To study the interaction of the molecule with the aqueous solvent, we examined the radial distribution function (rdf), referred to as g(r). Despite the fact that g(r) was calculated for all the atoms analyzed in MD simulations, we made the option to plot the g(r) function for groups of atoms representative of different regions of TTC. We could then identify possible regions of high or low affinity for water molecules. The results allow us to foresee the behavior of the two forms of the TTC in the physiological environment nearby the cell membrane.

Materials and Methods

Initial geometry for TTC was established starting from its structural formula, imposing the planarity of the benzene ring for the two possible protonated and unprotonated forms. For quantum mechanics calculations we chose the DFT B3LYP at level 6-31G** [6-9] in the Gaussian package [10] and the calculations, made after choosing the chelp G method, provided the charges [11] corresponding to the ground lowest-energy conformations structures for both protonated and unprotonated forms of TTC and the geometry used as the starting configuration for MD simulations. The dynamical studies were carried out using the Gromacs computational package [12] in the NPT ensemble in a water environment (water SPC216), fixing the number of molecules N, the isotropic pressure at 1 bar, and the temperature T of the system at 300 K[13,14]. In the Gromacs package, the groups CH₃ and CH₂ were

VOL. 106, NO, 5

treated as united atoms and the other atoms were explicitly represented.

The simulations were run for a total of 500 ps dynamics, and the Gromacs parameters for charge, interatomic distances, and bond angles were modified so that the initial structure for MD simulations corresponded to the results of quantum mechanics calculations. The parameters for the united atoms CH₃ and CH₂ were obtained adding the charges of the corresponding carbon and hydrogen atoms, and the positions, bond angles, and adjacent atoms are the same as those of the carbon.

Results

The results for atomic electronic charge obtained from quantum mechanical calculations (Table I) indicate that most atoms of TTC have only small modifications due to the protonation of the N-terminal. It is noticeable that the proton charge added to TTC in the protonated state is distributed throughout the molecule, so that all atoms negatively charged in the unprotonated molecule had the addition of some positive charge, decreasing its absolute value. The modification near the N-terminal is more dramatic, so that the Nitrogen changes its charge from negative to positive. In minor extent, the ester and the aliphatic chain are also affected (Table I).

The effects in the molecule solvation properties due to the modifications in the electronic structure upon protonation/deprotonation were examined through the g(r) function, which describes the average solvent density $\rho(r)$ at a distance r from a given solute particle. The presence of an atom at the origin of the reference system excludes other particles at distances smaller than the radius of the first coordination shell corresponding to the first maximum in g(r). The presence of the first coordination shell tends to exclude particles at distances closer than the radius of the second coordination shell, where g(r) has another maximum. The oscillatory form for g(r) persists until r is larger than the range of correlation between the particles. At distances larger than the correlation length, for uncorrelated particles, g(r) is equal to one. Considering the solvent as water molecules, values of g(r) of >1.0 indicate that the atom or group of atoms in the region under consideration is hydrophilic, and values off <1.0 indicate that the analyzed region is hydrophobic.

To make analysis of g(r) more comprehensible, we divided the molecule in four groups of atoms (Fig. 1).

INTERNATIONAL JOURNAL OF QUANTUM CHEMISTRY

TABLE I Atomic charges for tetracaine obtained from DFT

calculations using the chelpg option in Gaussian 03 package."

Atom		Charges			
No.	Туре ^я	Protonated	Unprotomated		
1	С	0.65843	0.70798		
2	С	-0.20553	-0.20597		
3	С	-0.02105	0.01118		
4	HC	0.08243	0.07277		
5	С	0.01830	0.02076		
6	HC	0.09935	0.08706		
7	С	-0.25067	-0.27783		
8	HC	0_11994	0.11608		
9	С	-0.31150	-0.32759		
10	HC	0_14134	0.13001		
11	С	0.45804	0.46540		
12	N	-0.62812	-0.68337		
13	н	0.32542	0.32500		
14	0	-0.50671	-0.53851		
15	OA	-0.42920	-0.47951		
16	CH.	0.31663	0.30522		
17	CH	0_11781	0.20775		
18	NO	0.03401	-0.46019		
19	CH ₀	0.19885	0.12843		
20	CH	0.20681	0.12843		
21	CH	0.25163	0.25615		
22	CH.	0.25163	0.25615		
23	CH,	0.05802	0.06705		
24	CH	-0.01955	-0.03748		
25	н	0.28275			

* Numbers of atoms refer to convention adopted in Figure 1. * Atom type convection: C: bare Carbon; HC: Hydrogen bound to Carbon; N: peptide Nitrogen; H: Hidrogen not bound to Carbon; O: carbonyl Oxiger; OA: hydroxyl Oxiger; CH,, CH, allphatic CH, or CH, group.

The region I is the aliphatic chain corresponding to atoms 21, 22, 23, and 24 in Figure 1; the region II contains the secondary amine (atoms 12 and 13) and the benzene ring (atoms 02–11); the ester group (atoms 01, 14, 15, 16) forms the region III; and the region IV consists of the tertiary amine, made by atoms 17, 18, 19, and 20, plus the hydrogen atom (atom 25), in the protonated molecule. This last region of TTC molecule has peculiar properties and we used independent plots of g(r) functions for CH₂ atoms and the hydrogen atom added to the molecule.

The plots of g(r) show that solvation properties of regions I, II and III of TTC are not significantly modified with protonation/deprotonation (Figs. 2–4). Figure 2 shows that the plots for the region I of unpro-

1279

BERNARDI ET AL.



FIGURE 2. Plot of radial distribution function for the aliphatic region (Region I) of TTC. +, protonated TTC; •, unprotonated TTC.

tonated TTC (curve \bullet) and protonated TTC (curve +) are similar so that the traces are indistinguishable. The g(r) function has a peak with intensity ~1.1, at a distance of 0.4 nm (Fig. 2). These values indicate a weak hydrophilic character in that region of TTC. Fig. 3) does not present any peak, and its intensity is <1.0 even at distances to water molecules as large as 1.0 nm. Since g(r) determines the average density of water molecules at a coordinate r relative to this region, we could say that region II is hydrophobic. The same hydrophobic character is present in the protonated molecule (curve + in Fig. 3), where the

The region II is clearly hydrophobic: the g(r)function of the unprotonated molecule (curve \blacklozenge in



FIGURE 3. Plot of radial distribution function for the secondary amine and the benzene ring (Region II) of TTC molecule. +, protonated TTC; •, unprotonated TTC.

VOL. 106, NO. 5



FIGURE 4. Plot of radial distribution function for the ester group (Region III) of TTC molecule. +, protonated TTC; , unprotonated TTC.

intensity of g(r) function takes values near to 1.0 only at distances near 1.0 nm from water molecules. The plots for the region III shows that the ester group of ITC has the same hydrophobic character both in protonated as unprotonated forms (Fig. 4), the differences being irrelevant to the behavior of the molecule in the aqueous environment. The small "peaks," with intensities of <0.20 in unprotonated and protonated TTC, at ~0.18 nm from water solvent, are due to carboxyl oxygen, and have minor effects in the hydrophobic/hydrophilic behavior of the molecule.

In contrast to the others, region IV, which corresponds to the tertiary N-terminal, changes significantly with protonation/deprotonation. That region is only slightly hydrophilic in the unprotonated molecule and has high hydrophilicity when TTC is protonated. The g(r) function of the amine C-terminal atoms display this change in the affinity to water: in the protonated molecule there are peaks with intensity greater than the normalized value at distances of 0.35 nm (curve + in Fig. 5). In contrast, in the unprotonated molecule the peak of g(r), present at same distance, have intensities near to or less than the normalized values (curve \blacklozenge in Fig. 5).

Conclusions

The methods employed in our calculations proved useful to describe the non-homogeneous

INTERNATIONAL JOURNAL OF QUANTUM CHEMISTRY

character of TTC with respect to its affinity to the water solvent molecules. We could identify different regions of the molecule with varied degree of hydrophobicity and the modifications in the affinity to water caused by changes in its state of protonation. The unprotonated TTC has a predominantly hydrophobic character, clearly present not only in the aromatic ring, but also in the ester chain, while some small affinity to water is present in the region of the aliphatic chain and the tertiary N-terminal. On the other side, the protonated molecule acquires hydrophilic character not only in the aliphatic chain terminal but also in the tertiary N-terminal.

Despite the possible specific interaction of TTC with membrane proteins, the differences in hydrophobicity between protonated and unprotonated forms are relevant to the interaction with the cell membrane. The results show that the TTC molecule in a water/membrane interface should behave differently, depending on its state of protonation: the neutral molecule will insert into the lipid phase of the membrane, keeping the aliphatic terminal pointing to the more polar head groups; the protonated TTC will have the central aromatic ring and ester group penetrating into the nonpolar region of the membrane, and the terminals anchored in the surface. The results are consistent with the proposal of a mechanism of action pH dependent. When both forms are present in equilibrium at the water/ membrane interface, the protonated form would penetrate less into the membrane, compared to the

BERNARDI ET AL.



FIGURE 5. Plot of radial distribution function for the distances between CH_a and water solvent for region IV. +, protonated TTC; ◆, unprotonated TTC.

unprotonated form that can go further inside the bilayer. However, the decrease in the anesthetic action of the molecule lowering the medium pH, more than a result of general changes in the degree of penetration of TTC into the membrane, can be related to the positioning of both aliphatic and Nterminals of the anesthetic in the polar region in the surface of the membrane.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Professor Michel Loos for support in the use of Gaussian 03.

References

- Hauet, N.; Artzner, F.; Boucher, F.; Grabielle-Madelmont, C.; Cloutier, I.; Keller, G.; Lesleur, P.; Durand, D.; Paternostre, M. Biophys J 2003, 84, 3123.
- Teixeira, C. V.; Itrl, R.; Casallanovo, F.; Schreier, S. Biochim Biophys Acia 2001, 1510, 93.
- 3. de Paula, E.; Schreier, S. Braz J Med Biol Res 1996, 29, 877.
- Da Motta Neto, J. D.; Bicca De Alencastro, R.Int J Quantum Chem 1996, 61, 959.
- Shibaia, A.; Ikawa, K.; Terada, H. Biophys J 1995, 69, 470.
- Hohemberg, P.; Kohn, W. Phys Rev 1964,136, B864; Phys Rev 1965,140, A1133.
- 7. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Phys Rev B 1988, 37, 785.

- 8. Becke, A. D. J Chem Phys 1993, 98, 5648.
- 9. Becke, A. Phys Rev A 1988, 38, 3098.
- 10. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Monigomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burani, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakaisuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Klizo, O.; Nakal, H.; Klene, M.; Ll, X.; Knox, J. E.; Hraichian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperis, R.; Straimann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochierski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cul, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Closlowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Kelth, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian (3; Revision B.04; Caussian: Pittsburgh, PA, 2003.
- 11. Sigiridsson, E.; Ryde, U. J Comp Chem 1998, 19, 337.
- van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Hess, B.; Feenstra, K. A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. Gromacs User Manual; version 3.1.1; Nijenborgh 4, 9747: AG Groningen, The Netherlands, 2002 (www.gromacs.org).
- Lindahl, E.; Hess, B.; D. van der Spoel, J Mol Mod 2001, 7, 306.
- Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. Comp Phys Commun 1995, 91, 43.

ANEXO 7.2 – ARTIGO PUBLICADO (BERNARDI ET AL. 2007):



Introduction

ocal anesthetics (LA) in clinical use are tertiary amines and, despite their different structures, share chemical features that are relevant to their biological function: an aromatic ring, a polar group, and an ionizable amine with relatively high pKa values of 7.5-9.0 [1]. Consequently, in a physiological medium local anesthetic cations partially dissociate into charged and uncharged forms, in a pHdependent process. It has been shown that strongly hydrophobic charged anesthetics were easily partitioned into hydrophobic environments such as surface-adsorbed films and micelles, whereas weakly hydrophobic charged anesthetics were hardly or not partitioned into such environments [2, 3]. Since local anesthetic molecules must be transferred from solution to the hydrophobic environment of biological membranes to give rise to anesthetic action, it is suggested that the uncharged forms of LA, supposedly strongly hydrophobic, are necessary for the physiological activity.

LA are also known to induce their anesthetic effect by blocking inward sodium transport and therefore, the action potential of axons [1], and partitioning into the lipid bilayer can modulate the ss of LA to their hinding sites in Na+ channels [4, 5]. These molecules are also known to bind to other membrane proteins, affecting their function [6], and to interact with membrane lipids, altering their organizational properties [7-10]. Such changes in biological membranes could interfere with lipid-protein interactions, leading to protein conformational changes that may reflect on their activity [11, 12].

Although studies conducted at physiological pH have indicated that local anesthetic activity is related to the protonated form, the importance of the uncharged species has been increasingly recognized in view of the presumed existence of a binding site for the uncharged local anesthetic deep inside the hydrophobic membrane core [4, 5] and a pronounced partitioning and perturbation of lipid bilayer organization for uncharged local anothetic species [13]. A correlation is also recognized between local anesthetic hydrophobicity, potency, and toxicity [14, 15], and it is believed that the stronger binding of the uncharged species to the membrane would protect LA from blood clearance, justifying long lasting anesthesia [8].

There are two basic classes of LA: amino-amides and amino-esters. Tetracaine (TTC) is an ester de-

WATER SOLVENT AND LOCAL ANESTHETICS



FIGURE 1. Schematic representation of the local anesthetics in charged form and with numerated atoms The CHn are grouped over the carbon atoms.

rivative of p-aminobenzoic acid in which a buryl chain replaces one of the hydrogens on the p-amino group. Procaine (PRC) is the ester derivative of p-aminobenzoic acid and diethylaminoethanol. Lidocaine (LDC) is an aminoethylanide (Fig. 1). The physicochemical behavior of LA is a consistent and somewhat predictable function of their structures, whereas clinically, the potency is usually defined by the total mass (or moles) of drug required to relieve or prevent pain, produce tactile numbness, or effect inhibition of sympatheticor motor activity. By comparison, TTC is approximately 10 times more potent than PRC, while LDC has approximately twice the potency of PRC [16]. LA molecules with larger alkyl groups on both the tertiary amine nitrogen and the aromatic moiety show greater hydrophobicity and perturbing effects on the lipid bilayer order according to the order tetracaine (ester type) > lidocaine (amide type) > procaine (ester type), which is in agreement with the clinical potency of the LA [9].

Despite the accumulation of experimental studies about the molecular mechanisms for action of LA, not much work has been devoted to theoretical computation of those molecules. A recent report gave some insight regarding the structure of the LA tetracaine and its pharmacological action through calculations performed using the density functional theory (DFT) method [17]. The results indicated

VOL. 107, NO. 7 DOI 10.1002/cua INTERNATIONAL JOURNAL OF QUANTUM CHEMISTRY 1643

DERNARDI ET AL.

that the molecule has regions with different degrees of hydrophobicity, and the pH dependent activity of TTC should be analyzed in view of local changes in different regions of the molecule rather than in terms of general effects on the hydrophobicity of the molecule as a whole.

In this work, we studied the structural characteristics of tetracaine, lidocaine, and procaine in protonated (charged) and deprotonated (uncharged) states using the DFT method. Ab initio calculations were made to obtain the geometry and charges of each atom to be used as starting points for molecular dynamics (MD) simulations. To evaluate the effects of water solvent on the properties of LA molecules, we examined the radial distribution function (RDF), known as g(r) function, and the formation of hydrogen boads which allowed us to identify regions of high and low water affinity. The results yield us elements to investigate the behavior of the LA molecules in an environment resembling the physiological medium, as well as a comparison with selected experimental results.

Materials and Methods

The geometries found in the literature were used as initial inputs for the structure calculations, and to obtain a low-energy ground state, we imposed planarity of the aromatic ring. The optimized molecular geometries for both protonated and deprotonated forms of the LA were obtained by the DFT/ B3LYP method with the 6-31G** basis set [18–22]. The atomic charges were fitted to reproduce the molecular electrostatic potential through the ChelpG scheme [23, 24].

The MD studies were made using the GRO-MACS package [25]. The GROMOS 43a1 parameter set was used with modifications to charges, bond angles, and distances, according to the ab initio results. The molecules were solvated with SCP water model [26] in a cubic box and simulated in a NPT ensemble. The systems were thermodynamically coupled to a 300-K bath and pressure coupling was at 1 bar [27, 28]. Electrostatic and van der Waals interactions were considered to a "cut-off" of 1 nm, and the simulation time-step was set to 2 fs. An initial energy minimization was carried out followed by a 500-ps simulation to equilibrate all systems before a production run of 5 ns.

The relation between water solvent and LA was analyzed using the calculation from the RDF of the dynamics. The g(r) function is defined as the average radial density of a certain observable to a distance r from an origin that provides an insight regarding the local structure of the surrounding media such as hydration shells for a solvated molecule. For 7 larger than the correlation distance, the RDF decays to the media density, usually normalized to one. A statistical approach of the g(r) function can yield the potential of mean force (PMF), indicating the force between the atoms of interest. The PMF function is defined as: $W(r) = -kT \ln g(r)$, whereas the force can be obtained by the gradient of this function. If g(r) is higher than one, In g(r) is greater than zero and the potential is attractive. On the other hand, if g(r) is lower than one, the potential is repulsive. The number of atoms contained in a shell is obtained by integrating the function 4mpr g(r) in the appropriate distance interval [29]

However, in addition to the amplitude of g(r), the distance r of the first hydration shell is also necessary to analyze the type of interactions between atoms or molecules. In polar groups for instance, a hydrogen bond occurs at the limit of r =0.35 nm connecting donor and acceptor, with bondangle tolerance of 30°. Considering these parameters, we made a time-dependent hydrogen bond calculation. The evaluation of the RDF and hydrogen bonds shows the possible allocation for the water coordination shell around each atom present in the LA, allowing us to analyze the hydrophobicity pattern on each part of this molecule, as well as of the LA as a whole.

Results and Discussion

ATOMIC CHARGES

The calculations performed with the ChelpG method demonstrated that atomic charges in all LA molecules did not change significantly with protonation. The only relevant modification was observed at the site of protonation (Table I); the charge of the nitrogen of the amine terminal (numbered N17 for LDC, N19 for PRC, and N18 for TTC in Fig. 1) charged from approximately -0.5 e for the deprotonated LA to a slightly positive value in the protonated state. A small oscillation of charge values were also found on carbons that are first neighbors of protonated nitrogen. A similar result was already reported for TTC [17].

The solvation properties of the LA molecules were analyzed using the g(r) function, which describes the average density of the solvent as a func-

1644 INTERNATIONAL JOURNAL OF QUANTUM CHEMISTRY DOI 10.1002/qua VOL. 107, NO. 7

WATER SOLVENT	AND	LOCAL	ANEST	IETICS
---------------	-----	-------	-------	--------

calculations.										
Lidocaine			Procaine			Tetracaine				
Atom	Neutral	Charged	Atom	Neutral	Charged	Atom	Neutral	Charged		
C01	-0.05369	-0.01633	C01	0.61308	0.62726	C01	0.70798	0.65843		
H02	0.09310	0.10836	G02	-0.12325	-0.18465	C02	-0.20597	-0.20534		
C03	-0.19779	-0.20442	C03	-0.03140	0.01172	C03	0.02076	0.01830		
H04	0.11432	0.13431	H04	0.08729	0.10250	H04	0.08706	0.09935		
C05	-0.24713	-0.22260	C05	-0.02817	-0.00240	C05	0.01118	-0.02105		
H06	0.12660	0.13561	H06	0.08954	0.10098	H06	0.07277	0.08243		
C07	0.09496	0.10246	C07	-0.26354	-0.32003	C07	-0.32759	-0.31150		
C08	0.01305	0.03003	108	0.13121	0.14862	H08	0.13001	0.14134		
C09	0.11980	0.14153	C09	-0.27351	-0.31234	C09	-0.27783	-0.25057		
C10	-0.00671	-0.00295	H10	0.13052	0.14785	H10	0.11608	0.11994		
C11	0.38880	0.03614	C11	0.41852	0.60134	C11	0.46540	0.45804		
N12	-0.52452	-0.44375	N12	-0.80944	-0.96888	N12	-0.6833	-0.62812		
C13	0.27920	0.32197	H13	0.34805	0.43570	H13	0.32500	0.32542		
C14	0.53810	0.61246	H14	0.34948	0.43487	014	-0.53851	-0.52671		
015	-0.49268	-0.49500	015	-0.48758	-0.54590	O15	-0.47961	-0.42920		
C16	0.07473	-0.04148	016	-0.43826	-0.38714	C16	0.30522	0.31663		
N17	-0.55193	0.11573	C17	0.27982	0.31092	C17	0.20775	0.13781		
C18	0.31021	0.21290	C18	0.19912	0.07557	N18	-0.46019	0.03401		
C19	0.24307	0.33390	N19	-0.58265	0.01993	C19	0.12843	0.19885		
C20	-0.07431	-0.00114	C20	0.26993	0.14408	C20	0.12843	0.20681		
C21	-0.04718	0.02100	C21	0.25549	0.18299	C21	0.25615	0.25163		
H22		0.12127	C22	-0.05620	0.04460	C22	-0.01882	0.00228		
			C23	-0.07805	0.03387	C23	0.06705	0.05802		
			124		0.29854	C24	-0.03748	-0.01955		
						H25		0.28275		

Charge values for each atom from anesthetics, calculated via ChelpG on B3_YP/6-31G** quantum calculations.

The atoms numbers are the same as those in Figure 1.

TABLE I

tion of the distance r between a given atom, or a group of atoms of the molecule, and an atom from the solvent. Considering the solvent as water molecules, if the values of g(r) are greater than 1.0, the region around the atoms under consideration is hydrophulic, otherwise it is hydrophobic. g(r) greater than one implies that the local mean density at the distance r is higher than the volume density. Furthermore, if the distance of the first peak in g(r) is greater than 0.5 nm, the region has hydrophobic characteristics. We selected atoms or groups in the LA molecules to perform the analysis, as follows.

To understand how the water environment polarizes the anesthetics [30], we made calculations on TTC, using the Onsager continuum solvation model. The values of the charges obtained for each atom are very close to the charges calculated with the simpler methods which neglect polarization effects. Some modifications were observed for arematic ring carboa atoms; however, the difference with the ChelpG duarges is small. The benzene ring is a more hydrophobic part of the TTC molecules and the variations in charge should not affect the g(r) obtained without the polarization effects. As the later calculation is time consuming, it was not repeated for the other anesthetics.

PROTONATION SITE OF LA

Upon changes in the pH of the medium, a hydrogen ion can be associated to or dissociated from the nitrogen of the amine terminal. For the three LA in the protonated state, the plot of g(r) functions suggests the occurrence of water shell coordination around that hydrogen atom (Fig. 2). The aminoester type anesthetics PRC and TTC presented similar results, with the first peak in g(r) near to 0.19 nm, suggesting the formation of hydrogen bond

VOL. 107, NO. 7 DOI 10.1002/qua INTERNATIONAL JOURNAL OF QUANTUM CHEMISTRY 1645

BERNARDI ET AL.



FIGURE 2. Plots of g(r) for the hydrogen atom involved in the protonation of LA. The distance refers to oxygen atom. The inset shows g(r) extended to the second and third solvation layers. ▲ represents TTO, ♥ represents PRC, and ♦ represents LDC.

between the H atom and water oxygen, indicating a very hydrophilic environment in that region. In TTC, the second and third peaks in g(r) are slightly closer than that observed in the other anesthetics, (see Fig. 2), indicating that it has a more intense attractive interaction with water. For the aminoamide type anesthetic LLC, the first peak in g(r) is less intense and located at a larger distance compared to the other anesthetics. In that molecule, the relatively short distance between nitrogen in the amine group (atom N17 in Fig. 1) and carbonyl oxygen (atom O15 in Fig. 1) decreases the charge of the hydrogen, reducing the attractive interaction with water molecules.

The first sharp peak in g(r) of PRC and TTC also indicates the presence of an organized water structure, suggesting that some water molecules remain near the H atom. The analysis of the amino terminal groups, using a time-dependent hydrogen bond calculation, revealed a high prevalence of hydrogen bonds with water molecules for the charged forms of TTC (95.1%) and PRC (82.5%). For the uncharged molecules, the prevalence was much lower, TTC 25.8% and PRC 4.6%. The same hydrogen bonds analysis for LDC revealed a lower value than that observed for the anino-esters, 64.1% and 1.5% for the charged and uncharged forms, respectively. The hydrogen bond profile rationalizes the differences found in the RDF peaks and reinforces the relevance of the charge state to the penetration of LA on

the membrane since this portion on the charged forms is visibly hydrophilic.

CARBONYL OXYGEN

The g(r) function for the carbonyl oxygen (numbered 14 in TTC and 15 in PRC and LDC, Fig. 1) is dependent on the state of protonation of the LA. In the deprotonated state of the amino-esters TTC and PRC, the carbonyl oxygen hydrophilic character is indicated by the intense peak in g(r) located around 0.175 nm (Fig. 3). The same peak at 0.175 nm appears also in the g(r) function of uncharged LDC; however, its intensity is significantly lower than the value observed for TTC and PRC (Fig. 3). Since LDC is an amino-amide, the participation of carbonyl oxygen in the bond involving the nitrogen amide of the aromatic ring (N12-C14-O15 in Fig. 1) seems to decrease its affinity to solvent water molceulca.

The protonation of TTC and LDC changes the polarity around the carbonyl oxygen, enhancing the local hydrophilicity, as indicated by the increase in the intensity of the first peak of g(r) function (Fig. 3). An opposite effect, however, was observed in PRC, whose g(r) function presents a small decrease in the intensity of the first peak when the molecule is protonated. The reduction of the first peakin g(r) for charged PRC (Fig. 3) reflects the small changes in the charge distribution on O15 (Table I) in the twisted structure of the molecule, which decreases the affinity to water, and the steric restrictions to the presence of additional solvent near to the water coordination shell already circumventing the neighboring H24 atom. The most significant



FIGURE 3. Plots of g(r) of oxygen carbonyl atoms. The distance refers to hydrogen atom of water. ▲ represents charged molecules and ♥ represents uncharged molecules.

1646 INTERNATIONAL JOURNAL OF QUANTUM CHEMISTRY DOI 10.1002/qua VOL. 107, NO. 7



FIGURE 4. Plots of g(r) for the region of the aromatic ring. The distance refers to the center of mass of water. ▲ represents charged molecules, while
 represents uncharged molecules.

changes of charge distribution affecting the carbonyl oxygen atom were found only on PRC (Table I).

AROMATIC RING AND AMINO TERMINAL

As expected, the plot of g(r) function for the aromatic region of all LA is consistent with the hydrophobicity of the aromatic group. There are no discernible peaks, and the intensities are always below 1.0 even at large distances from the origin (Fig. 4). In the same figure one can see that the hydrophobicity of the aromatic region in TTC has low sensitivity to the protonation state of the molecule and a small decrease in the intensity of g(r) was observed in PRC and LDC, which becomes more hydrophobic with bonding of a hydrogen atom to nitrogen amine.

In the region around the CH3 groups of the amine terminal, the protonation state of LA can be an important factor influencing the arrangement of the water solvent molecules. In the deprotonated LA, the first peak in g(r) is located at distances larger than 0.35 nm and the intensity is near to or below 1.0, indicating a hydrophobic environment (Fig. 5). Among the LA investigated, TTC is the least hydrophobic, which may be attributed to the greater proximity of CH3 to the nitrogen atom of the amine group, whereas for tetracaine it is a dimethylamine and for PRC and LDC they are diethylamines. On the other hand, the protonation of nitrogen amine increases the hydrophilicity in the CH₃ terminal as observed by the raise in the intensity of the first peak in g(r) to values above 1.0, sharpening of its shape, and slight decrease in the

VOL. 107, NO. 7 DOI 10.1002/qua

INTERNATIONAL JOURNAL OF QUANTUM CHEMISTRY 1647

WATER SOLVENT AND LOCAL ANESTHETICS

distance from the origin (Fig. 5). Another indication of increase in hydrophilicity of CH3 groups due to protonation of LA is the decrease in the distance of the second peak in g(r), and the most prominent effect is observed for TTC. It is also noticeable that enhancement in hydrophilicity due to protonation is more evident in LDC than PRC.

The RDF of the amine terminal of LA is shown in Figure 6. The plots of g(r) function indicate that the deprotonated amine group as a whole is hydrophobic. The highest hydrophobicity was observed for LDC, followed by PRC and TTC. In the charged molecules, g(r) functions indicate a small contribution of a hydrophilic component at short distances, around 0.20 nm, although the hydrophobic component at larger distances above 0.40 predominates in the plots (Fig. 6).



FIGURE 5. Plots of g(r) for CH_a amine terminal. The distance refers to the center of mass of water in tetracaine (A), procaine (V), and lidocaine (0); top: the charged molecules; bottom: the uncharged anesthetics.

BERNARDI ET AL.



FIGURE 6. Plots of g(r) for the entire amine terminal. The distance refers to the center of mass of water. ▲ represents TTC, ♥ represents PRC, and \otimes represents LDC.

Conclusions

The results discussed indicate the nonhomogeneous character of LA with respect to their affinity to water solvent molecules. It was possible to identify different regions of the molecule with degrees of hydrophobicity as well as the variations in the affinity to water caused by changes in their charge state effectively observed by de Paula et al. [6, 13]. This observation is relevant considering the interaction of LA with the lipids, which modulates the physiological activity [8]. The lipid bilayer is also inhomogeneous, with regions of different polarity, varying from the hydrophilic interface with the aqueous medium to the very hydrophobic inner region [8].

Tetracaine has an acyl chain bound to the pamino group, conferring a high degree of hydrophobicity. A general observation was that, the more hydrophobic the uncharged anesthetics, the higher the physiological and hemolytic effects [9, 10], whereas TTC is the most active compound. In addition, the decrease in mobility of lipids at the interface, together with an increase in mobility in the hydrocarbon region, was promoted by anesthetics, the extent of effects following the order tetracaine > lidocaine > procaine.

However, when analyzing the different moieties of the aresthetics, we observed that, in uncharged form, the most hydrophobic compound in the regions of carbonyl oxygen, aromatic ring, and methyl groups is LDC, an amide type anesthetic, instead of the ester type anesthetics TTC and PRC. This result correlates with the detailed NMR observations that changes in the membrane organization are promoted in greater extent by LDC in comparison with TTC [8]. The verification that different regions of the lipid membrane bilayer respond differently to the binding of uncharged anesthetics [12] emphasizes the importance of the knowledge of the properties of different regions of the anesthetics.

In charged LDC and PRC, surprisingly, the hydrophobicity of the aromatic ring increases compared with that of the uncharged anesthetics, an effect which has its counterpart in the increase of hydrophilicity around the protonated nitrogen and, for LDC, in carbonyl oxygen as well. Hydrophilicity in carbonyl oxygen decreases in PRC because of conformational changes imposing steric restrictions to the presence of water near that atom. As already reported, minor changes in the aromatic ring occurs upon protonation of TTC. On the other hand, the methyl groups in the amino terminal become slightly less hydrophobic in protonated LA, a modification more evident in LDC. Thus, protonation of anesthetics enhances the amphiphilic character of the molecules, avoiding interpretations purely based on the attribution of hydrophobic character to uncharged and hydrophilic character to the charged molecules.

Several properties of membranes such as interface's charge density, hydration of the lipid bilayer, intermolecular hydrogen-bonded network among phospholipids molecules and/or protein molecules, rotational mobility of the hydrocarbon chain are altered because of the incorporation of LA into membranes. In addition to direct interaction with sodium channels, anesthetics may also interact with membrane lipids, affecting properties such as fluidity with effects on the transport of Na+ and K+ in nerve membranes, leading to anesthetic action. It thus becomes important to take into account local properties of the different parts of anesthetics such as those revealed by our calculations.

The potency of anesthetics is correlated to their strength and the time necessary for the effect to occur. However, for the deprotonated molecule, the hydrophilic character is reduced and in the more liposoluble form, the anesthetics' effect is weaker. As the aromatic region is very liposoluble for all the anesthetics, the region of amine terminal should be very important to understand the process of membrane penetration. We note in Figure 6 that the uncharged form of TTC is more hydrophilic, followed by PRC and LDC. This result is in agreement with the sequence for the potency of the anesthetics and also with the decreasing sequence for their pKa, indicating that the anesthetics' character is related to intrinsic properties of specific groups inside the molecules. With higher pKA, more charged molecules will be anchored on the interface watermembrane at physiological pH. This may also lead, in many cases, to destabilization of the membrane, causing the reported hemolytic effects.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Juliana A. Passipieri for helpful discussions on local anesthetics.

References

- Butterworth, J. F.; Strichariz, G. R. Anesthesiology 1990, 72, 711.
- 2. Singer, M. A. Biochem Pharmacol 1977, 51.
- Smith, I. C. P.; Auger, M.; Jarrell, H. C. Ann NY Acad Sci 1991, 625, 668.
- Ragsdale, D. S.; Mcphee, J. C.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. Science 1994, 265, 1724.
- Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93, 9270.
- de Paula, E.; Schreier, S. Brazilian J Med Biol Res 1996, 29, 877.
- 7. Shibaia, A.; Ikawa, K.; Terada, H. Biophys J 1995, 69, 470.
- Fraceio, L. F.; Pinio, L. D. A.; Franzoni, L.; Braga, A. A. C.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E. Biophys Chem 2002, 99, 229.
- Yun, I.; Cho, E. S.; Jang, H. O.; Kim, U. K.; Choi, C. H.; Chung, I. K.; Kim, I. S.; Wood, W. G. Biochim Biophys Acta 2002, 1564, 123.
- Fraceio, L. F.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E. Biophys Chem 2005, 115, 11.
- Hille, B.; Couriney, K.; Dunn, R. Molecular Mechanisms of Anesthesia; Raven: New York, 1975.
- 12. Lee, A. G. Nature 1976, 262, 545.
- de Paula, E.; Schreier, S. Biochim Biophys Acta 1995, 1240, 25.
- Matsuki, H.; Simada, K.; Kaneshina, S.; Kamaya, H.; Ueda, I. Colloid Surf B: Biointerifaces 1998, 287.
- 15. Malheiros, S. V. P.; Pinio, L. M. A.; Goilardo, L.; Yokaichiya,

WATER SOLVENT AND LOCAL ANESTHETICS

D. K.; Fraceto, L. F.; Meirelles, N. C.; de Paula, E. Biophys Chem 2004, 110, 213.

- Yagiela, J. A. Pharmacology and Therapeutics for Dentistry; Mosby: Philadelphia, 1986.
- Bernardi, R. C., Gomes, D. E. B., Pascutil, P. G., Ito, A. S., Ota, A. T. Ini J Quantum Chem 2006, 106, 1277.
- (a) Hohemberg, P.; Kohn, W. Phys Rev B 1964, 136, 864; (b) Hohemberg, P.; Kohn, W. Phys Rev A 1965, 140, 1133.
- 19. Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. Phys Rev B 1988, 37, 785.
- 20. Becke, A. D. J Chem Phys 1993, 98, 5648.
- 21. Becke, A. D. Phys Rev. A 1988, 38, 3098.
- 22. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Chaeseman, J. R.; Monigomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burani, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi J.; Barone, V.; Mennuccii, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasewaga, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Klizo, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hraichlan, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperiis, R.; Stratmann, R. H.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Sirain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavacharl, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cul, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Ciolowski, J.; Siefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaroni, I.; Mariin, R. L.; Fox, D. J.; Kelith, T.; Al-Laham, M. A.; Feng, C. Y.; Nanayakkaira, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03, Revision B.04; Caussian: Pittsburg, P.A, 2003.
- 23. Sigéridsson, E.; Ryde, U. J Comput Chem 1998, 337.
- Breneman, C. M.; Wilberg, K. B. J Comput Chem 1990, 11, 361.
- van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Hess, B.; Feenstra, K. A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. Gromacs User Manual; Nijenborgh, Groningen, The Netherlands, 2002. (www.gromacs.org)
- Berendsen, H. J. C.; Posima, I. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, I. Intermolecular Forces; Reidel: Dordrecht, Holland, 1981.
- Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. J Mol Model 2001, 7, 306.
- van Drunen, R.; van dier Spoel, D.; Berendsen, H. J. C. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 1995, 209, 49-COMP.
- 29. Filipponi, A. J Phys: Condensed Matter 1994, 41, 8415.
- McDonald, N. A.; Carlson, H. A.; Jorgensen, W. L. J Phys Org Chem 1997, 10, 563.

VOL. 107, NO. 7 DOI 10.1002/qua INTERNATIONAL JOURNAL OF QUANTUM CHEMISTRY 1649

ANEXO 7.3 – ARTIGO PUBLICADO (BERNARDI ET AL. 2007):

Melecular Simulation, Vol. 33, No. 14, December 2007, 1135-1141



Density functional and molecular dynamics simulations of local anesthetics in 0.9% NaCl solution

R. C. BERNARDITT, D. E. B. GOMEST, A. S. ITOT, A. T. OTAS, P. G. PASCUTTIT and C. TAFTT

(Departamento de Fásica Aplicada, Centro Bessileiro de Peoquisas Fásicas, CBPF, Rio de Jamiro, RJ, Bravil Laboratório de Madelagem e Diristerica Moincoche, Instituto de Biofínica Caelos Chagas Fillos, Universidade Federal do Rio de Jamiro, RJ, Bravil (Departamento de Fúsica e Matemática, Facultade Filosofia,Cinecias e Latena de Rineirião Pento, Universidade de São Paulo, USP, Riberão Pento, SP, Bravil (Departamento de Fúsica, Carter de Cinecias Exat, Universidade Estabulad de Londrina, UEL, Londrina, PR, Bravil

(Received 1 May 2007; in final form 8 August 2007)

We have made density functional calculations and molecular dynamics (MD) simulations to investigate the structure and pharmacological action of local anesthetics: tetracaine, provaine and lidocaine. The MD simulations were made in a NPT essemble, in a 0.9% NaCl solution, on both unprotonated and protonated forms of the molecules. The radial distribution function was used to study solvent effects in different regions of the molecules. Although all three amendetics, have different egions of the molecules. Although all three amendetics have different egions. The charged animo-sters present hydroghilicity on the ester as well as anime terminals. G⁻ from the solvent solution forms hydrogen bonds via protonated hydrogen attached to nitrogen, yielding neutral molecules, which could, in principle, pearented the monthesis and look C⁻ to at in the protonated form. Density functional theory calculations indicated a duage in the electrostatic potential and showed that C⁻ weakly binds to the amine hydrogen, what suggests it is a favorable interaction and supports the existence of the hydrochioloc forms of these local anesthetics.

Keywords: Molecular dynamics simulations; Local ane abetics; Tetracaine; Lidocaine; Procaine

1. Introduction

The physico-chemical properties of local anesthetics (LA) such as tetracaine (TTC), procaine (PRC) and lidocaine (LDC) (figure 1) have been of considenable theoretical and experimental interest. TTC and PRC are amino-esters composed of an ionizable amine, a polar group and an aromatic lipophilic ring. The amino groups should be able to dissolve in the cellular environment and remain on either side of the nerve membrane. The aromatic ring is soluble in lipids which is important for penetration through the lipid bilayer of the nerve cell membrane. For amino-amide LDC, an amide connects the lipophilic aromatic ring to an amine with an extra nitrogen in the carboxyl group (C=O).

In particular, it is believed that the charge state, hydrophobicity, hydrophilicity as well as the effects of solvents play important roles in pharmaceutical properties which determine whether the anesthetic is capable of going through the cellular membrane, shutting down the ions pathway, or remain attached to the surface of the cellular membrane determining the potency and extension of the anesthetic [1-5].

Apparently, the uncharged form is more capable of going inside membrane, mean while, the charged molecule remains attached on the interface. The anesthetic effect could come from both forms, but in different ways. It is possible that the organization of the charged form would help its docking on the ion channel, shutting it down. Meanwhile, the uncharged LA could disarrange the lipids from the membrane, thus changing the channel conformation and leading to an anesthetic effect. Therefore, there are two hypothesis: the first one refers to the binding between transmembrane protein (ion channel) and drug; the second one refers to the interaction between LA and membrane lipids, changing their structure and closing the ion channel [4–8].

In this work we have used density functional theory (DFT) and molecular dynamics (MD) simulations to investigate TTC, PRC and LDC with different protonation

Molecular Simulation E-SN 0092-7022 pice/KS SN 1029-0425 online © 2007 Taylor & Prance http://www.tandf.co.uk/parmais D-O:1:10.1004097270201620626

[&]quot;Corresponding author: Email: her marli@ chef he



Procaine

1136



Lidocaine



Figure 1. Schematic representation of the LA in the protonated form and with numberated atoms. 814 × 1027 mm (72 × 72 DPI).

states and concentrations of NaCl solutions. We determined radial distribution functions g(r) for groups of atoms in order to examine hydrophobicity, hydrophilicity as well as the interaction of the LA with the NaCl solvents. The MD simulations also indicate a stable interaction between Cl⁻ of the solution with hydrogen of protonated form of the local anesthetics.

2. Methodology

The computer models of LDC, PRC and TTC were constructed based on molecular structures deposited on CAS (Chemical Abstracts Services—http://www.cas.org) from American Chemical Society. For each LA, two forms were built protonated and a deprotonated. The optimized molecular geometries were obtained by quantum mechanical (QM) calculation with the DFT/B3LYP method and the 6-31G++ basis set using Gaussian03 package [9-10]. The atomic charges were fitted to reproduce the molecular electrostatic potential through the ChelpG scheme [11].

The polarization effects of solvent on LA [11] were evaluated on TTC using the Onsager continuum solvation model [12]. The obtained charges for each atom were very close to the charges calculated with the simpler methods (DFT/B3LYP without Onsager model) which neglect polarization effects. As the later calculation is time consuming, it was not repeated for the other LA.

The MD studies were made using the GROMACS package [13]. For LA and ions the GROMOS 43a1 [14-15] parameter set was used with modifications to LA partial atomic charges, bond angles and distances, according to the *ab-initio* results. The LA were placed in the center of a cubic periodic box, 4.5 nm length, and hydrated with two distinct solutions, one with pure SPC water model [16], and other with 0.9% NaCl (27 NaCl molecules in ~3000 water molecules varying little with LA) in a total of 12 simulation systems. This salt concentration falls into the range of concentration that have been applied in pharmacological experiments [17].

The simulations were carried out in the NPT ensemble and the systems were thermodynamically coupled in every step to a 300K bath and pressure coupling was at 1 bar, with Berendsen models [18]. Non-bonded interactions were considered to a "cut-off" of 1 nm, and the simulation time-step was set to 2fs. An initial energy minimization was carried out followed by a 2 ns simulation to equilibrate all systems before a production run of 5ns.

The radial distribution function (RDF), know as g(r)function, is defined as the average radial density of a certain observable to a distance r from an origin that provide an insight regarding the local structure of the surrounding media such as hydration shells for a solvated molecule [19]. The g(r) function can be used to identify hydrophilic and hydrophobic groups and regions of affinity to the solvent as well.

The structure for $LA-CI^-$ complex for QM calculations was produced by placing the CI⁻ atom in the same bond plane and 0.3 nm away from amine hydrogen, distance derived from MD, and optimized by B3LYP/6-3IG**. Constraints were applied to maintain the protonation state of the amine. The MD simulation of this complex was carried out after a 1 ns run with position restraints (force constant = 1000 kJ/(mol nm²)) to TTC-CI⁻ complex followed by a production run of 1 ns in the same conditions described above.

3. Results and discussion

The charge distribution for the investigated LA indicates a larger variation in amine nitrogen for the charged molecules which is a result of the extra hydrogen that attaches to nitrogen (N18, N19, and N17 in figure 1 to TTC, PRC and LDC, respectively). The negative charge of N for the LA in the neutral form assumes a positive charge when the local anesthetics are charged, as showed in our previous work [8].

The relation between solvent and LA was analyzed using the calculation from the RDF of the dynamics. LA can be divided into some regions (figure 1). The region 1 is a tertiary amine (dimethylamine on TTC and diethylamine on PRC and LDC), the second region is ester for some anesthetics, like TTC and PRC, and an amide for LDC. The region 3 is singular for each anesthetic but an aromatic ring is a common feature in all LA. The first region is of particular interest as the protonation site of molecules and has important features such as coordination of water shells and affinity to different portions of biological membranes, and will be more investigated for all three LA.

3.1 Region 1

The g(r) of water for the amine hydrogen shows a reasonable difference in the intensity of the first peak (figure 2). This intensity is lower in NaCl simulations, suggesting its presence around this region or even a disturbance on the water coordination shell around this amine hydrogen. To investigate a possible interaction between the proton and C1 we monitored their minimal distance through simulation (figure 3). The distance distribution shows that the Cl- ion may occasionally interact with the amine hydrogen, for all LA. The close distances occur within short lifetimes, probably due to weak binding between Cl⁻ ion and the LA [20-22] and a limitation of classical mechanics to reproduce electronic effects that would stabilize this interaction. To override this limitation and check the possibility of a stronger interaction we performed QM calculations using DFT B3LYP/6-31G** for more precise data.

The geometry optimization indicated for TTC, a H25-C1⁻ distance of 0.168 nm, the ChelpG charge for C1⁻ was -0.63e and the H25 changes from 0.28e to 0.12e. For PRC the H24-C1⁻ distance was 0.180 nm, the charge for C1 was -0.64e and for H24 changes from 0.30e to 0.12e. For LDC the H22-C1⁻ distance was 0.185 nm whereas the H13-C1 distance was 0.223 nm, the charge for C1⁻ was -0.61e and the H22 changes from 0.12e to 0.065e. The charge distribution and the smaller distance among these atoms suggest the existence of an interaction for these groups.

In the QM calculation with CI⁻, the three LA folded in different ways to weakly bind to the hydrogen that protonates the LA (figure 4). For TTC, only the amine terminal is slightly rotated to permit the H25–CI⁻ bond. In PRC the amine rotated around 180° to accommodate the H24–CI⁻ bond. In LDC this same region also rotated around 180° for the H22–CI⁻ bond and formed an additional H13–CI⁻ bond (2.23 Å). The conformational changes lowered the internal energy of the LA compared





Figure 2. Bots of g(r) for the hydrogen atom involved in the protonation of LA molecules, without NaCl (♥), with 0.9% NaCl'water solution (▲). 650 × 1 208 mm (72 × 72 DPI).



Figure 3. Plots of distance between the closest Cl[−] to the hydrogen atom that protonated the LA—tetracaine (▲), proceine (♥) and lidocaine (♦). 1212 × 850 mm (72 × 72 DPI).

to simulations without Cl⁻, what suggests it is a favorable interaction and supports the existence of hydrochloric forms of these local anesthetics.

4. Conclusions

Using the new conformation and charge values we performed a MD only for TTC to test how long will CI⁻ be connected to the drug in a purely classical dynamics. For this system a Ins MD simulation with position restraints for LA-CI complex was carried out followed by an unrestrained Ins MD simulation. The distance between CI⁻ and H25 does not remain constant with CL⁻ going away from the LA in the first MD steps. In this simulation we are treating the system classically and not imposing any other constraints to the reproduce LA-CI bond interaction. As only the non-covalent interactions are considered the charge difference between the two groups is not sufficient to stabilize the system.

3.2 Region 2 and 3

Analogous to our previous work of anesthetics in pure water solution [8], the three LA investigated in this paper are mostly hydrophobic or weakly hydrophilic in regions 2 and 3, the RDF which is indistinct from the water solvent analysis (data not show). In general the protonated forms of LA are slightly more hydrophilic than the deprotonated molecules. Region 3, characterized by the aromatic ring, is clearly hydrophobic for all three LA in both the protonated and deprotonated forms in saline solution as well as in water [3]. It is noticeable from this work that the presence of NaCl affects the protonated form of the LA turning then into slightly more hydrophilic molecules. DFT and MD calculations are useful to describe the interactions and predict practicable pharmacological trends for the LA with solvent solutions and assist the development of models to explain whereas the LA penetrates the cell membrane or remain attached to its surface, and determine the potency and length of the anesthesia. The investigated LA showed a different degree of hydrophobicity, hydrophilicity and affinity to the solvent solution depending on the charge of the molecules, but the presence NaCl affects only the water shell around of amine-terminal of protonated molecule. It is possible that, for being a polar region, it is more susceptible to binding to NaCl and the probability of a local distrubance in the water coordination shell is greater than in others portions' of the molecules.

With quantum data we propose the following model, Cl⁻ attaches to hydrogen of the charged species, neutralizing the molecule charge helping it to penetrate the membrane. The LA-Cl⁻ interaction, known as hydrochloric form, is seen in various experimental procedures [20-22]. It is also known that it is easier for the neutral species to penetrate the membrane [5-6] and this would be facilitated by the bonding of H and Cl⁻. After penetrating the membrane, we expected that the anesthetic separates from the Cl⁻, regaining its charged form to interact with ion channels inside the cell membrane.



Figure 4. Caption from DFTB3LYI96-31 G++ calucation. In gray we have the output file without CIT and in black the output with CIT. 546 × 782mm (72 × 72 DPI).

Adknowledgements

The authors are grateful for the support from CNPq, CAPES and FAPERJ.

References

- B. Berman, J. Flores, D. Pariser, R. Pariser, T. De Arsujo, C. Ramirez. Self-warming liclocaine/tetracaine patch effectively and safely induces local anesthesia during minor dematologic procedures. *Dermatol Surg.*, 31, 135 (2005).
 N. Hauet, F. Artzner, F. Boucher, C. Grabielle-Madelmont,
- [2] N. Hauet, F. Artzner, F. Boucher, C. Grabielle-Madelmont, I. Cloatier, G. Keller, P. Lesieur, D. Durand, M. Paternostre. Interaction between artificial membranes and enflurane, a general volatile an esthetic: DIPC-enflurane interaction. *Biophys. J.*, 84, 3123 (2003).
- [3] C. Teixeira, R. Irri, F. Casallanovo, S. Schreier. Local anestheticinduced microscopic and mesoscopic effects in micellus. A fluorescence, spin label and SAXS study. BBA-Biomembranes, 1510, 93 (2001).
- [4] S. Schreier, S. Malheiros, E. De Paula. Surface active drugs selfassociation and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *BBA-Biomembranes*, 1508, 210 (2000).
- [5] L. Fraceto, L. Pinto, L. Franzoni, A. Braga, A. Spisni, S. Schmier, E. De Paula. Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys. Chem.*, 99, 229 (2002).
- [6] L. Pinto, L. Fraceto, M. Santana, T. Pertinhez, S. Junior, E. De Paula. Physico-chemical characterization of hemocaine-hetacyclodextrin inclusion complexes. J. Pharmaceut. Biomed., 39, 956 (2005).
- [7] R. Bernardi, D. Gomes, P. Pascutti, A. Ito, A. Ota. Theoretical studies on water-tetracsine interaction. Int. J. Quantum Chem., 106, 1277 (2006).
- [8] R. Bernardi, D. Gomes, P. Pascutti, A. Ito, A. Ota, C. Taft. Water solvent and local aneschetics: a computational study. *Int.J. Quantum Chem.*, 107, 1642 (2007).
- [9] M.J. Fräch, G.W. Tracks, H.B. Schlagel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery E., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennacci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsugii, M. Haka, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukada, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Hunda, O. Kibo, H. Nakai, M. Mene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperta, R.E. Strakmann, O. Yaoyev, A.J. Auatin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochuroki, P.Y. Ayala, K. Monokuma, G.A. Voh, P. Salvador, J.J. Danmenberg, V.G. Zakrawski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck,

K. Raghavachazi, J. B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Goslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaroni, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Narayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gotzalez, J.A. Pople, Gaussian 03, Revision B.04, Gaussian, Inc., Pittsburg, PA (2003).

- [10] E. Sigfridsson, U. Ryde. Comparison of methods for deriving stomic charges from the electrostatic potential and moments. J. Comput. Chem., 19, 377 (1998).
- [11] C. Breneman, K. Wiberg. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials—the need for high sampling density in formamide conformational-analysis J. Comput Chem., 11, 361 (1990).
- [12] L. Onsager. Electric moments of molecules in liquids. J. Am. Chem. Soc., 58, 1486 (1936).
- [13] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. Mark, H. Berendsen. Gromacs: fast, flexible, and free. J. Comput. Chem., 26, 1701 (2005).
- [14] W.F. Van Gusteren, S.R. Billeter, A.A. Eising, P.H. Hunenberger, P. Krager, A.E. Mark, W.R.P.I.G. Tironi. Biomole cular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. VdF. Hochschulverlag AG an der ETH Zurich and BIOMOS h. v, Zurich, Gronigen. ISBN 3 7281-2422 2 (1996).
- [15] W.R.P. Scott, P.H. Hunenberger, I.G. Tironi, A.E. Mark, S.R. Billeter, J. Fennen, A.E. Tonla, T. Huber, P. Krager, W.F. Van Gusteren. The GROMOS biomolecular simulation program package. J. Phys. Chem. A, 103, 3596 (1999).
- [16] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. Van Gunsteren, J. Hermans. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration in Intermolecular Forces, p. 331, Reidel Publishing Company, Dordrecht (1981).
- [17] T. Librowski, R. Czamecki, M. Pasenkiewicz-Gierula, J. Grochowski, P. Senla, S. Lochyński, B. Frąckowiak. Multidisciplinary studies of chiral carane derivatives with a strong local sme sthetic activity. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 113 (2000).
- anae shetic activity. Ear. J. Pharm. Sci., 11, 113 (2000).
 [18] H. Berendsen, J. Postma, W. Vangunsteren, A. Dinola, J. Huak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. J. Chem. Phys., 81, 3684 (1984).
- [19] A. Filipponi. The radial-distribution function probed by X-rayabsorption spectroscopy. J. Phys. Condens. Mat., 6, 8415 (1994).
- [20] A. Schmidt, I. Schwarz. Solid state characterization of hydroxyprocaine hydrochloride. Crystal polymorphism of local anaesthetic drugs, Part VIII. J. Mol. Struct., 748, 153 (2005).
- [21] T. Drewa, Z. Wolski, P. Galazka, D. Olszewska-Slonina, D. Musialkiewicz, R. Cząkowski. Lack of local anesthetic properties of lidocaine gel in an experimental model. Unil. Int., 76, 359 (2006).
- [22] L. Jorkjend, L. Skoglund. Comparison of 1% and 2% idocaine hydrochloride used as single local anesthetic: effect on postoperative pain course after oral soft tissue surgery. *Method Find Exp. Clin.*, 21, 505 (1999).

Molecular Physics Vol. 107, No. 14, 20 July 2009, 1437–1443



RESEARCH ARTICLE

Molecular dynamics study of biomembrane/local anesthetics interactions

R.C. Bemardiae, D.E.B. Gomesa, R. Gobatob, C.A. Tafter, A.T. Otab and P.G. Pascuttia

^aInstituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil; ^bDepartamento de Física, Universidade Estadual de Londrina, Brazil; ^cDepartamento de Física Aplicada, Centro Brasileiro de Pesquisas Física;, Brazil

(Received 22 November 2008; final version received 26 March 2009)

It is still controversial how local anesthetics (LAs) act upon the nervous system and how the membrane contributes to this process, since probably the most important active site of the LAs is located in the sodium channels, a trans-membrane protein. An important role of the bio-membrane would be the stabilization and orientation of local anesthetics molecules, reducing their translational and rotational degrees of freedom, which could reinforce the mechanisms which interrupt the nervous impulse. This study aims to perform a computational analysis of the LAs behaviour in the membrane, and the effect of the water/membrane interface on their stabilization and orientation. Analysis by molecular dynamics (MD) showed that the charged form of these drugs are oriented at the interface, while the neutral form can easily cross the interface, entering the membrane, in agreement with the most recent experimental results in the literature. In contrast, it is here suggested that benzocaine (BZC), which exists only in its uncharged form in physiological media, behaves like the charged anesthetics, remaining stabilized and oriented at the interface. This could explain the similar anesthetic effect of BZC and the charged forms of tetracaine (TTC) and lidocaine (LDC).

Keywords: local anesthetic; DPPC; membrane; molecular dynamics

1. Introduction

The detailed mechanism of action of beal anesthetics (LAs) has been the subject of various controversial investigations [1–5]. The most accepted hypothesis describes the uncharged form of LA crossing the cellular membrane, while the charged form attaches to the membrane surface [2,6–8]. This attachment is performed via their amino terminal, which is very hydrophilic and cannot cross the water/membrane interface.

There is evidence of several local anesthetics binding sites in ionic channels, i.e potassium and sodium. The action of local anesthetics (LAs) has been well tested in the voltage-gated sodium channels according to Hille's modulated receptor hypothesis [1,9,10] which indicates that LAs act mainly by inhibiting sodium influx through sodium channels. When the sodium influx is interrupted, the signal conduction is inhibited. It is known that LAs interact with several kinds of ionic channels. More research is still required to better understand this interaction and resulting side effects.

Regarding the local anesthetics structure, there are two main types of LAs: the amino-amide and the amino-esters. In our work, we investigate three of these drugs [1–8], two amino-esters, Tetracaine (TTC) and Benzocaine (BZC), and one amino-amide, Lidocaine (LDC). TTC was selected because it is a powerful, but toxic, local anesthetic, one of the most used in medicine for many years, while LDC is actually the most common amino-amide anesthetic used. BZC however, is the most intriguing LA because, in physiological media, it is found only in the uncharged form. Due to its lower pKa, BZC should have a different mechanism of action or it would be the proof that uncharged LAs can be responsible for the anesthetic effect.

At physiological pH, the charged and uncharged forms of the LA molecules exist in equilibrium but only the uncharged form diffuses readily across the membrane/water interface. Once inside the cell, the uncharged form can be charged again and will not return through the lipid bilayer membrane [11], whereas the balance between the charged and uncharged forms is favorable to the uncharged species. However, it is known that the interaction, at least with the sodium channel, must occur with the charged form of the LAs [3,12]. In the sodium channel, the receptor's binding site is thought to be located at the segment S6 on the IV domain, in the cytoplasmic (inner) portion [13]. In its charged form, the LA should bind inside the ion channel near to the cytoplasmic end. Another possible method of action of the LAs is the binding affinity with cellular membranes, perturbing phospholipid bilayer structures and the ionic channel functions. Alterations in the organization of lipid bilayers are likely to constitute a general mechanism for the modulation of membrane protein functions.

In this work, we aim to investigate the local anesthetic molecules behaviour when they are close to the water-membrane interface. It is known that the changes caused by the LAs in the membrane properties could modulate the ionic channels [14]. We also know that the sodium channel is not the only channel that interacts with local anesthetics [1,15,16]. Potassium channels interact with these drugs and some of these channels, such as the TREK-1 (a K2P channel), have an important region that is sensitive to drugs in the intercellular interface region [14,16]. K2P channels can contribute to the local anesthetic-induced neuroexcitability. TREK-1 could contribute indirectly to the local anesthetic effect by increasing the number of sodium channels in the inactive state, which facilitates the local anesthetics - sodium channel binding. It is also believed that K2P plays an important role in the undesirable LAs side effect [15].

In our previous work, we studied the LAs diffusion towards the membrane using simulated trajectories in order to investigate how these molecules cross the membrane interface and stabilize. Because of their amphiphilic character, it is possible that the LAs interleave the membrane molecules, crossing the polar head of the lipid in the water/membrane interface. To better understand the relation between LAs and the water/membrane interface, we also investigated the solvation properties of these drugs in a water box with periodic boundary condition [17].

In this work, we have investigated the explicit interaction between LAs molecules and a DPPC (1,2dipalmitoylphosphatidylcholine) bilayer.

2. Methodology

The computer model for LAs was constructed in accordance with Pub-Chem (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) registrics: 2337 for BZC, 3676 for LDC and 5411 for TTC. The method employed was DFT/B3LYP [18-21] with the 6-31G** basis set [22,23] in Gaussian03 package [24]. The atomic charges were fitted to reproduce the molecular electrostatic potential through the ChelpG scheme [25]. The atomic distances, bond angles, dihedrals and charges from the lowest energy conformation were used to calculate the force field parameters for these drugs, according to GROMOS force field (see Supplementary Material which is available via the multimedia link on the online article webpage). Torsional parameters should govern the conformational preferences of the LAs. Lidocaine and tetracaine in particular are eminently flexible. Conformational changes of these molecules is expected to couple to their partitioning and interaction with lipids.

The LAs molecules were solvated in a box with SCP water model [26] with \sim 3800 water molecules and 64 phospholipids (DPPC bilayer) with periodic boundary conditions and simulated in the N γ T ensemble [27,28]. The drugs were placed randomly in water, at least 1.0 nm far from the membrane surface. The molecular dynamics (MD) studies were made using the GROM ACS package [29,30]. The parameters for the DPPC (1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine) membranes were obtained from Dr Tieleman's work [28] and the LAs were parameterized according to the GROMOS 43a1 parameter set [31] as previously described [17].

The systems were thermodynamically coupled at 320 K using the Berendsen thermostat [32] and anisotopic pressure coupling, according to Tieleman's model [28], using Parrinello-Rahman barostat [33,34]. Electrostatic interactions were represented by Particle-Mesh Ewald (PME) [35] with cut-off of 0.9nm, while van der Waals interactions were considered to a cut-off of 1.0 nm. All bonds were constrained using the LINCS algorithm [36], the geometry of SCP water molecules was constrained using the SETTLE algorithm [37] and the time-step for integration was set to 2 fs. Before the simulations a water relaxation dynamics was carried out with 500 ps with position restraints for the membrane and the LA followed by an unrestrained run of 2ns for system equilibration. Production runs were performed with 50 ns and the simulation for TTC was extended to 100 ns.

To analyse the drug/membrane interaction of each anesthetic molecule, we monitored their position according to the z axis (perpendicular to the membrane's surface), taking into account two reference atoms indicated in Figure 1. We also analysed the position of the LAs inside the membrane. We selected the amino nitrogen and the last carbon in the opposite side of the molecule, to indirectly indicate the position of LAs in the membrane. Another way to analyse the relation between LAs and membrane or water was calculating the Radial Distribution Function (RDF) from the simulations. This method was used to analyse



Figure 1. Plot of the position of the reference atoms according to the z axis. The dashed line indicates the membrane interface position based on the phosphorus atoms. The control molecular dynamics simulation of solvated membrane model was made by 50 ns and is shown using a phosphorus atom as reference. For BZC, LDC-u, LDC-c, TTC-u and TTC-c, the triangles represents the reference atoms indicated here.

the interaction of amino terminal of LAs and the polar head of the phospholipids. physiological media, therefore, we refer to benzocaine only by BZC.

The RDF function, also known as g(r), is defined as the average radial density of a certain observable to a distance r from an origin that provides an insight regarding the local structure of the surrounding media such as hydration shelk for a solvated molecule. For r larger than the correlation distance, the RDF decays to the media density, usually normalized to one. From Helmholtz equations, a statistical approach of the g(r) function can yield the Fotential of Mean Force (PMF), indicating the force between the atoms of interest. The PMF function is defined as: $W(r) = -k_B T \ln g(r)$, where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature. The force can be obtained by the gradient of this function [38,39]. If g(r) is higher than one, $\ln g(r)$ is greater than zero and the potential is attractive. On the other hand, if g(r) is lower than one, the potential is repulsive. The number of atoms contained in a shell is obtained by integrating the function $4\pi r^2 g(r)$ in the appropriate distance interval [40,41].

In this work, when we use the suffixes -u and -c we refer to the uncharged and charged forms of the LAs, respectively. These terms are not applied to benzocaine, because it does not have a charged form in

3. Results and discussion

Using molecular dynamics simulations, we observed that both uncharged and charged forms of LAs tend to approach the lipid media quickly. The charged form reaches the membrane more easily, and we believe that it is due to its polarity, especially at the amino terminal, where the extra charge privileges the long range interactions. These charges, were calculated using high level quantum mechanical methods [17].

To better understand the LAs membrane interaction, we plotted the position of two reference atoms along the z axis. This plot (Figure 1) shows that LDC-c and TTC-c quickly approach the membrane due to the strong interaction between the amino terminal and the polar bilayer surface. As the LDC-u and TTC-u come near the phospholipids, they promptly cross the interface and enter the membrane between the dashed lines in Figure 2. We observed that LDC-u and TTC-u, while approaching the membrane, criented their lipophilic portion towards the membrane and inserted them completely. At first, the lipophilic portion



Figure 2. Schematic illustration of local anesthetic position in membrane after ~40 ns of simulation. Note that amino terminal of BZC, LDC-c and TTC-c are attached to the polar heads of the membrane. Plot produced on VMD.

assumed a position parallel to the phospholipids, and then became free inside the membrane.

Preliminary MD simulations in water solution have indirectly shown that these charged anesthetics could attach to the membrane surface, due to their high amphiphilicity, while the uncharged form penetrates the membrane, due to their high hydrophobicity. The results, discussed ahead, will show that the molecule, in the charged form, attaches to the membrane surface in less than 10ns, which corroborates with our previous amphiphilicity studies [17,42].

Figure 1 also indicates that, even though BZC is the only one found in the uncharged form, it behaves just like the LDC-c and TTC-c, which are charged anesthetics, stabilizing perpendicularly oriented to the water/membrane interface. BZC lines up with the phospholipids tails of the membrane. Figure 2 illustrates the information found in plots shown in Figure 2, which exhibit the alignment of the charged forms of LAs and the peculiar behaviour of BZC, also aligned with the lipid tails. This figure demonstrates that LDC-u and TTC-u are located in the non-polar portion of the DPPC membrane, as well. The alignment of charged LAs and BZC with the attachment of the amino-terminal to the polar heads of the lipids removes translational and rotational degrees of freedom of these drugs, which may improve their chance to encounter their binding site at the ion channel. These simulations indicate that the charged form might have an essential role in the local anesthetic effect. Another interesting feature shown in Figure 1 is that the charged form begins its trajectory near the interface. It occurs because, in the previous relaxation dynamics, the charged form arrives near the membrane while the uncharged form remains distant from the membrane.

To make sure that the binding of LAs, in their charged form, to the membrane is long-lasting, we extended the TTC dynamics to 100 ns. The Figure 3 shows that, during the 100 ns, the behaviour of the TTC did not modify when compared to Figure 1. We were not able to analyse how the drugs disrupt the membrane, because in our system studies, the simulation was carried out with only one local anesthetic molecule at a time. Our main purpose was to study how these drugs interleave the membrane, since in water this conformation occurs due to the high amphiphilicity of the charged form of LAs [17,42]. One of the main reasons that led us to simulate only one drug molecule in the box is that, due to the experimental observed interaction between them [43], simulation artefacts could mislead the results. The concentration effect could be studied through larger membrane patches, whereas, with higher drugs concentration, we could study the effect of the drugs on the pressure developed by the membrane in the wall of the simulation box. This interface area could be important for the local anesthetic interaction and its side effects. The alignment at the interface could help



Figure 3. Plot of the position of the tetracaine reference atoms, indicated in the Figure 1, according to the z axis. The dashed line indicates the membrane interface position based on the phosphorus atoms. At the top TTC-c and in the bottom TTC-u.

us understand the establishment of possible interactions with protein domains in this region.

Membrane parameters, such as the area per lipid and order parameter for lipids are consistent with the values defined by Tieleman membrane model [28]. The lipid area remains around 0.59nm2 during all the simulations. In another analysis, we counted the average number of hydrogen bonds of the TTC relative to DPPC in the long MD simulations. This analysis indicates that the uncharged form has an average of 0.019 H-bonds for each step of dynamics, while the charged form has 1.219 H-bonds, which are all located in the amino-terminal. It also helps us to confirm that the N-terminal holds the charged form on the bilayer surface. The RDF was analysed for TTC molecules for both states. Figure 4 shows the g(r) value of phosphorus atoms, from DPPC, around amino-terminal nitrogen. The charged form shows two phosphorous layers around nitrogen amino near 0.5 and 1.35 nm. There is a significant reduction of g(r) value near the drug when the molecules are in the uncharged state, because of the randomly position far away from the membrane/water interface.

The g(r) function indirectly yields the interaction potential energy between two groups. In this case, we observed that the potential well at the water/ membrane interface, calculated with Helmholtz equation, that anchors the molecule is approximately 1.77 kcal/mol for the charged form, while it is only 0.41 kcal/mol for the uncharged form. It indicates that the charged form has a more stable position in the interface, when compared to the uncharged form. We notice that the interaction between the charged form



Figure 4. Radial Distribution Function of phosphorus atoms, from DPPC, around amino-terminal nitrogen. In detail the complete g(r) profile for the charged tetracaine. Up triangles represents the TTC-u and down triangles TTC-c.

and the polar head of the membrane is very intense and attractive. The interaction of the uncharged form is very weak when compared to the interaction of the charged one.

4. Conclusion

A detailed description of local anesthetics mechanisms of action is still an open debate. The action of the drugs is still not fully elucidated. In this work, we analyse what occurs to a local anesthetic molecule in the interface region, between water and the membrane. This is important since sodium and potassium channels, which are important molecular targets of these drugs, have domains that interact with drugs, such as local anesthetics, in the region near to the membrane and suffer indirect effects caused by these drugs in the membrane.

This work confirms the experimental studies that indicate that uncharged form of LAs penetrates the membrane while the charged one remains attached to water/membrane interface [1,2,9,10] However, our work suggests that BZC, which exists only in its uncharged form in physiological media, behaves as the charged form of the other LAs, which disagrees with the most accepted mechanisms. This could indicate that BZC would not require an alternative mechanism as proposed in the 1970s, when the charged form was believed to be the active form of these drugs [44–46]. By reduction of the number of degrees of freedom, the membrane could catalyse the molecular interactions, especially near to the polar head, a unique region for interaction in some ionic channels. It increases the binding probability between drugs and their transmembrane protein target [47].

Using PMF calculations we obtained that the interaction potential energy, between the tetracaine and the membrane polar head, is approximately three times the thermal energy K_BT for the charged form, whereas it is smaller than the thermal energy for the uncharged form. These values indicate that the charged form has a more stable position in the interface, when compared to the uncharged form, as previously mentioned.

Also, it is possible that this position, close to the lipid polar head if the higher drug concentrations are maintained, could increase the lateral pressure upon the ionic channel, which could physically cause interference in its shape and function. Moreover, the molecular structure of the charged forms of local anesthetics, and also BZC, behave in such a manner that they take up the position of one of the phospholipids, which could facilitate the interaction with some portions of the channel that are stuck above the membrane surface, as believed to occur in the K_{2P} channels.

Acknowledgements

We acknowledge support from CNPq, Faperj, Capes, Fapesp (Brazil).

References

- J.F. Butterworth and G.R. Strichartz, Anesthesiology 72 (4), 711 (1990).
- [2] H.A. Fozzard, P.J. Lee, and G.M. Lipkind, Curr. Pharm. Des. 11 (21), 2671 (2005).
- [3] C.J. Hogherg and A.P. Lyubartsev, Biophys. J. 94 (2), 525 (2008).
- [4] G.M. Lipkind and H.A. Fozzard, Mol. Pharmacol. 68 (6), 1611 (2005).
- [5] K.A. McCormick, L.L. Isom, D. Ragsdale, D. Smith, T. Scheuer, and W.A. Catterall, J. Biol. Chem. 273 (7), 3954 (1998).
- [6] F.L.Sirota, P. G Pascutti, and C. Anteneodo, Biophys. J. 82 (3), 1207 (2002).
- [7] A. Shibata, K. Ikawa, and H. Terada, Biophys. J. 69 (2), 470 (1995).
- [8] K. Ueta, T. Suzuki, M. Sugimoto, I. Uchila, and T. Mashimo, Reg. Anesth. Pain Med. 32 (6), 462 (2007).
- [9] B. Hille, J. Oen. Physiol. 69 (4), 497 (1977).
- [10] G.K. Wang, C. Quan, and S. Wang, Plugers Arch 435 (2), 293 (1998).
- [11] J.R. Elliott, D.A. Haydon, and B.M. Hendry, Pflugers Arch 409 (6), 596 (1987).

- [12] A. Avdeef, K.J. Box, J.E.A. Comer, C. Hibbert, and K.Y. Tam, Pharm. Res. 15, 209 (1998)
- [13] D.S. Ragsdale, J.C. Mcphee, T. Scheuer, and W.A. Catterall, Science 265 (5179), 1724 (1994).
- [14] E. Honoré, Nature Rev. 8, 251 (2007).
- [15] M.A. Punke, T. Licher, O. Pongs, and P. Friederich, Anesth. Analg. 96, 1665 (2003).
- [16] C. Kindler and C.S. Yost, Regional Anesthesia Pain Med. 30 (3), 260 (2005).
- [17] R.C. Bernardi, D.E.B. Gomes, P.G. Pascutti, A.S. Ito, C.A. Taft, and A.T. Ota, International J. Quantum Chem. 107 (7), 1642 (2007).
- [18] P. Hohenberg and W. Kohn, Phys. Rev. B 136 (3B), R864 (1964)
- [19] W. Kohn and L.J. Sham, Phys. Rev. 140 (4A), 1133 (1965).
- [20] C.T. Lee, W.T. Yang, and R.G. Parr, Phys. Rev. B 37 (2), 785 (1988).
- [21] A.D. Becke, J. Chem. Phys. 98 (7), 5648 (1993).
- [22] G.A. Petersson, A. Bennett, T.G. Tersfeldt, M.A. Allaham, W.A. Shirley, and J. Mantzaris, J. Chem. Phys. 89 (4), 2193 (1988).
- [23] G A Petersson and MA Allaham, J Chem Phys 94 (9), 6081 (1991).
- [24] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Cli ord, J. Cicalowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkam, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johrson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, and J.A. Pople, Gaussian 03, Revision B.04 (Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004).
- [25] C.M. Breneman and K.B. Wiberg, J. Computat. Chem. 11 (3), 361 (1990).
- [20] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, and J. Hermans, *Internolecular forces*, in *Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration* (Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1981), pp. 331-342.
- [27] S.J. Marrink, D.P. Tieleman, A.R. vanBuuren, and ILJ.C. Berendsen, Faraday Discussions 103 (100), 191 (1996).

1442

- [28] D.P. Tieleman and H.J.C. Berendsen, J. Chem. Phys. 105 (11), 4871 (1996).
- [29] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, and H.J. Berendsen, J Computat Chem. 26 (16), 1701 (2005).
- [30] E. Lindahl, B. Hess, and D. van der Spoel, J. Mol. Modeling 7 (8), 306 (2001).
- [31] W.R.P. Scott, P.H. Hunenberger, I.G. Tironi, A.E. Mark, S.R. Billeter, J. Fennen, A.E. Torda, T. Huber, P. Kruger, and W.F. van Gunsteren, J. Phys. Chem. A 103 (19), 3596 (1999).
- [32] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postrna, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, and J.R. Haak, J. Chem. Phys. 81 (8), 3684 (1984).
- [33] S. Nose and M.L. K.lein, Mol. Phys. 50 (5), 1055 (1983).
- [34] M. Parrinello and A. Rahman, J. Appl. Phys. 52 (12), 7182 (1981).
- [35] T. Dardien, D. York, and L. Pedersen, J. Chem. Phys. 98 (12), 10089 (1993).
- [36] B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, and J.G.E.M. Fraaije, J. Computat. Chem. 18 (12), 1463, September (1997).

- [37] S. Miyamoto and P.A. Kollman, J. Computat. Chem. 13 (8), 952 (1992).
- [38] D.D. Carley, Phys. Rev. 131 (4), 1406 (1963).
- [39] M. Bamdad, S. Alavi, B. Naja, and E. Keshavarzi, Chem. Phys. 325 (2), 554 (2006).
- [40] A. Filipponi, J. Phys. Condensed Matter 6 (41), 8415 (1994).
- [41] A.P. Lyubartsev and A. Laaksonen, Phys. Rev. E 52 (4), 3730 (1995).
- [42] R.C. Bernardi, D.E.B. Gomes, P. G. Pascutti, A.S. Ito, and A.T. Ota, International J. Quantum Chem. 106 (5), 1277 (2006).
- [43] Norihito Kitagawa, Mayuko Oda, and Tadahide Totoki, Anesthesiology 100 (4), 962 (2004).
- [44] T. Narahashi, M. Yamada, and D.T. Frazier, Nature 223 (5207), 748 (1969).
- [45] D.T. Frazier, T. Narahashi, and M. Yamada, J. Pharmacol. Exp. Ther. 171 (1), 45 (1970).
- [46] L.M. Pinto, D.K. Yokaichiya, L.F. Fraceto, and E. de Paula, Biophys. Chem. 87 (2–3), 213 (2000).
- [47] K. Jorgensen, P. Hoyrup, T.B. Pedersen, and O.G. Mouritsen, Cell Mol. Biol. Lett. 6 (2A), 255 (2001).

ANEXO 7.5 – ARTIGO PARA SER PUBLICADO (GOBATO ET AL. 2010):

ESTUDO DA DINÁMICA MOLECULAR DE AGREGAÇÃO DE BENZOCAÍNA EM SOLUÇÃO AQUOSA

Ricardo Gobato', André Tsutomu Ota, Marcelo Hidalgo Cardenuto

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Física, Laboratorio de Biofísica e Modelagem Molecular, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitario, Cx. Postal 6001, 86055-900, Londrina, PR, Brasil.

Rafael de Castro Bernardi, Diego Enry Barreto Gomes e Pedro Geraldo Pascutti

Universidade Federal do Rio do Rio de Janeiro, Instituto de Biofisica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Física Biológica / Laboratório de Modelagem e Dinámica Molecular, Ilha do Fundão, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MOLECULAR DYNAMICS STUDY OF BENZOCAINE AGGREGATION IN WATER SOLUTION

Abstract

There are experimental evidences that the uncharged form of local anesthetics penetrates the axon membrane, while the charged form binds to the water-lipid interface. This hypothesis is controversial since the local anesthetic benzocaine which has pKa near 2.5, does not have the charged type at physiological media. By placing the anesthetics in a fixed length water box we can study, by molecular dynamics simulations, the behavior of raising concentrations and observe the formation of aggregates by monitoring the minimal distances among these molecules and accompanying the radial distribution function of water molecules to benzocaine. The benzocaine generally form clusters of molecules with increasing hydrophobic character as observed in experimental studies. This increased hydrophobic character would probably permit the anesthetic action without a charged type but as a side effect it may affect the integrity of neuronal membranes and causing neural injury.

Keywords: Benzocaine, Clusters, Molecular Dynamics.

INTRODUÇÃO

A ação dos anestésicos locais (LAs) foi bem testada nos canais de sódio de acordo com a hipótese de Hille's do receptor modular^{1,4} no qual indica que os LAs agem principalmente por inibição do influxo de sódio através dos canais de sódio. Quando o influxo de sódio é interrompido, o sinal de condução é inibido. O pH em meio fisiológico das formas protonada e não protonada dos LAs está em equilíbrio, mas somente a forma não protonada penetra prontamente através da interface água/membrana. Uma vez dentro da célula a forma descarregada, pode ser carregada novamente, formando a forma protonada, a qual não retorna através da bicamada lipídica da membrana.⁴ O sítio receptor de ligação através do segmento Só localizado no dominio IV, dentro do citoplasma (parte interna) do canal de sódio⁵. Na forma protonada, a molécula se liga ao sítio de ligação do anestésico local no interior do canal iônico, próximo ao final do citoplasma. Outro possível modo de ação dos LAs é a afinidade de ligação com a membrana celular, esta afinidade perturba a estrutura da bicamada lipídica e consequentemente altera as funções do canal iônico. Alterações na organização da bicamada lipídica constituem o provável mecaniumo geral de modulação das funções das proteinas na membrana.⁶⁴

Anestésicos Locais (LAs) de uso clínico são as aminas tercitrias, e apesar de apresentarem diferentes estruturas, estas tem características químicas como partes relevantes de suas funções biológicas: um anel aromático, um grupo polar, e uma amina ionizável com pKs em geral relativamente alto, entre os valores 7,5-9,0. A exceção desta regra é etil-4-amino-benzoato, conhecido como benzocuma (BZC), um anestésico local (LA) que apresenta algumas particularidades divergentes dos outros LAs. Seu pKa é proximo de 2,5, assim virtualmente não apresenta a forma protonada em meio fisiológico, mas sua atividade apresenta as mesmas propriedades dos outros LAs. Assim, essas hipóteses gerais não são adequadas ao comportamento da BZC.

Evidências experimentais sugerem que os anestésicos locais podem se agregar com o aumento de sua concentração.* Para compreender as propriedades de agregação da BZC, realizamos da dinámica molecular (DM) em meio aquoso, calculando com diferentes concentrações da BZC. A possibilidade de agregação foi testada por nos, com 1 a 20 moléculas de BZC, aumentando-se a concentração de BZC em um caixa de água de dimensões fixas.



Figura 1. Representação esquemática de benzocaina com as identificações dos átomos e das cargas parciais calculados com B3LXP/6-31G** e ajustado com o esquema ChelpG.

METODOLOGIA

O modelo computacional construido para a BZC foi de acordo com PubChem registry 2337.¹⁰ A estrutura inicial e cargas da BZC (Figura 1) foi simulada em um calculo ab-initio usando o Campo de Reação de Onsager¹¹ para evitar efeitos de solventes. O método empregado foi DFT/B3LYP^{13.15} com um conjunto de funções de base 6-31G** ^{16,17} dentro do pacote do programa Gaussian03.¹⁸ As cargas atômicas foram ajustadas para representar um potencial eletrostático através do método ChelpG.¹⁹ As distâncias atômicas, ângulos de ligação, diedrais e cargas, foram utilizadas para parametrizar a BZC no campo de forças GROMOS96 (conjunto de parametros 43a1).²⁰

As moléculas de BZC foram solvatadas em um caixa cúbica com o modelo de água SPC²¹ com 4618 moléculas de água, em condições periódicas de contorno e simuladas em um ensemble NPT. O sistema foi termalizado a 300K, com tempo de relaxação de 0,1 ps, e pressão de acoplamento de 1 bar, com tempo de relaxação de 1 ps.^{22, 23} As interações Colombianas foram limitadas a 0,9nm e de Van der Waals a 1,0 nm, com a soma de Ewald,^{21, 24} com um tempo de passo definido de 2 fs. A energia de minimização foi obtida após 0,5 ns de simulação para o sistema entrar em equilíbrio termodinámico, antes da dinámica molecular de 5 ns. Todas as simulações e antises foram utilizadas com o pacote GROMACS.²²

Para estudar a agregação das moléculas de BZC, em função de sua concentração, estas foram colocadas aleatoriamente dentro da caixa de água. Foram simuladas de 1 a 20 moléculas do fármaco dentro desta caixa de água. A relação entre o solvente água e o LA foi analisada, calculando a função de distribuição radial (RDF). A RDF pode ser utilizada para calcular a concentração do fármaco.

A função RDF,^{15, 26} também conhecida como g(r), é definida como a densidade radial média de um solvente, por exemplo, à água, a uma distância r da origem que fornece a estrutura local do meio envolvente, ou seja, a capa de hidratação da molécula. Para uma distância correlacionada r muito grande, a função RDF decai para uma densidade média, usualmente normalizada para um.

Conforme as equações de Helmholtz, uma abordagem estatistica da função g(r) fornece o campo de potencial da força média (PMF), indicando a força entre os átomos de interesse. A PMF e definida como: $W(r) = K_b$ T ln g(r), onde K_b e a constantes de Boltzman, T é a temperatura. A força pode ser obtida pelo gradiente desta função.^{21,20} Se g(r) é maior que l, ln g(r) é maior que zero, e o potencial é atrativo. Por outro lado, se g(r) é menor que l, o potencial é repulsivo. O número de átomos contidos em uma casta esférica é obtido por integração da função²⁰ g(r) dentro de um intervalo de distância apropriado.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estudos da solubilidade da BZC em dióxido de carbono supercrítico foram medidos por Garmroodi et al.²⁰ em pressões que variam de (122 a 355) bar e temperaturas que variam de (308 a 348) K, demonstrando que a BZC tem solubilidade em fração molar entre 1,0.10⁴ e 1,2.10⁴ e que seus métodos de impregnação supercrítica são eficientes para tornar uma alternativa viável para a impregnação empregando solventes orgânicos. Outros estudos de solubilidade da BZC realizados por Peãa et. al.²⁰ foram realizados em etanol, agua e etanol-acetato de etila.

Aguado et al.¹⁰ em suas medidas de espectroscopia com laser pulsado a 7,8412 \pm 0,0008 eV (lasers em 34.134,4 e 29.109,3 cm-1) e 7,8421 \pm 0,0004 eV (34.144,8 e 29.105,7 cm-1), respectivamente, obtivaram os espectros da trans-BZC, para o estado zero de energia cinética do elétrons através de ionização de campo pulsado (Zeke-PFI) e em simulações computacionais em B3LYP/AUG-cc-p-VDZ, demonstraram ser cerca de 2.500 cm-1 menor que o experimental para os configuração dos confôrmeros. Verificou-se que a trans-BZC apresenta um número de estados vibracionais intermediários S1. Os espectros forneceram um limitar de energia para o sparecimento de redistribuição vibracional intramolecular (IVR) em 540 cm-1, no estado S1. Baci et al¹⁰ também analisaram os confôrmeros da BZC, encontrando três, um *trans* e dois gauge, com simulações computacionais em funcionais/níveis, como B3LYP/aug-cc-pvTZ e $\frac{3}{6}\frac{3}{2}\frac{1}{2}\frac{$ Mura et. al.⁴⁴ relata o desenvolvimento e análise in vivo de uma formulação lipossomal do anestetico local BZC. Todas as formulações de BZC lipossomal apresentam um efeito mais intenso do que a droga na suz forma simples. Experimentos de permeação de soluções da droga em gel contendo a mesma quantidade de etanol, como em formulações de lipossomas foi possível excluir um possível efeito potenciador deste solvente. Em multilamelares com o droga adicionada à fase hidrofilira apresentou maior eficácia, mostrando um valor de coeficiente de permeabilidade 2,5 vezes maior do que a droga pura e permitindo uma melhoria significativa, não apenas de intensidade, mas também da duração do efeito anestêsico de BZC. Pare Mura et. al.⁴⁴ seus resultados sugarem que, uma adequada formulação lipossomal da BZC pode ser de valor real para melhorar a sua eficácia clínica em amestesia tópica.

Não se sabe como a BZC interage com a membrana neural, mas sabe-se que pode levar a mutações na sua estrutura,³⁰ como em casos confirmados de uma dermatose papulonodular erosivas na área gezital e suprapúbica associados com BZC tópica, relatados por Kristi J. Robson et al.,³⁴ além de um caso de anafilaxia a BZC tópica na literatura inglesa relatado por Trien Vu et al.³⁰

Uma análise computacional do comportamento de LAs na membrana, e o efeito da água / interface membrana sobre a sua estabilização e orientação realizados por Bernardi et al.⁴⁸, demonstrou através de DM, que a forma catiônica dessas drogas são orientadas para a interface, enquanto a forma neutra pede facilmente atravessar a interface, entrando a membrana, de acordo com os resultados experimentais mais recentes na literatura. Em contrapartida, é aqui sugerido que BZC, que só existe em sua forma sem carga em mesos fisiológicos, comporta-se como os anestésicos praticados, mantendo-se estabilizado e orientada para a interface. Isso poderia explicar o efeito semelhante anestésico BZC e as formas de tetracaina e lidocaina.

A ação da BZC em blocos ainda não foi demonstrada, mas uma de suas peculiaridades é provavelmente devido a sua cinética rápida.³⁶ A diferença fundamental entre BZC e outras LAs é o coeficiente de Hill, o qual no caso da BZC não é igual a um.⁴⁶

Segundo Tikhonov et at.⁴¹ a principal via de ação de um LA é através do cumal aberto, o LA pode chegar ao interior dos poros através de um canal no quel o grupo de amina se liga através da forma catiénica do LA, no foco do canal de hélices, que também estabiliza um ton Na+ cercado por duas moléculas de BZC. O grupo catônico do LA e um ton Na+ no filtro de seletividade se repelem, sugerindo que a depleção de Na+ leva a inativação lenta e estabiliza um LA.

ThomasWeiser,⁴² analisou s BZC juntamente con outros bloqueadores dos canais de Na⁺ como a lidocaina, mexiletina e o ambroxol. Em seu estado e com as informações publicadas sobre os niveis plasmáticos clinicamente possíveis, ele estimou após administração sistêmica destas potentes drogas, a quantidade de droga que bloqueia o canal Na⁺ para induzir analgesia.

Como a BZC é um anestésico local, cuja solubilidade em água é baixa e sua aplicação e formulações é limitada a uso tópico, Pinto et al.⁴¹ estudou a caractarização dos complexos de inclusão de BZC in-ciclodeatrina (CD). Realizou estudos por calorimetria e microscopia eletrônica onde deu evidências da formação e da morfologia do complexo. Por Espectroscopia de fluorescência revelou um aumento de três vezes na solubilidade BZC, que pode ser alcançado mediante a complexação com CD. Além de que em estudos de toxicidade preliminar, o complexo parece de ser memos tóxico do que BZC para, uma vez que induziu uma diminuição da oxidação *in vitro* de hemoglobina humana. Estes resultados sugarem que o complexo BZC in-CD, representa uma nova formulação para aumentar a eficácia da solubilidade BZC em água, transformando promissor para uso fora do seu aplicação tradicional, ou seja, em anestesia infiltrativa.

Allaboun et al." investigou a solubilização miscelar e taxa de dissolução da BZC em agua e em soluções de lauril sulfato de sódio.

Para Fraceto et at.⁴⁰ que realizou um estudo das propriedades estruturais e dinâmicas de vestculas unilamelares de fosfatidilcolina de ovo em pH 7,4 e 10,5 para determinar a localização preferencial da BZC no interior da bicamada, a BZC apresenta uma inserção mais profunda na bicamada lipídica localizando-se entre o glicerol e os primeiros carbonos da cadeia acila. Mudanças na organização de vestculas unilamelares pequenas foram daterminadas atravás de espectroscopia da infravemielho com transformada de Fourier. A BZC apresentou efeito apenas na segião da carbonila, mas por outro lado

causou uma diminuição ao acesso das moléculas de água, fazendo com que ocorresse um deslocamento das frequências para uma região de maior energia, que a BZC (região próxima ao glicerol).

Pinto et al." modiu as propriodados de absorção, solubilidade em agua e coeficientes de partição (P) estre n-octanol, ovo fosfatidilcoline, lipossomas e eritrócitos para BZC. A interação de BZC com lipossomas foi medida através de Ressonância Paramagnética Eletrônica, com giro de posições diferentes na cadeia do lipossomas. Mudanças em organização de lipídio em adição de BZC permitiram a determinação de valores de P, sem separação de fase. Os resultados " apresentados referçam a importância de considerar interações hidrofóbicas na interpretação dos efeitos de anestésicos em membranas, sua aplicação tópica" requeratenção cuja concentração e toxicidade" deve ser observada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se a formação de agregados, na DM do LA na caixa de água simulada, ao estudar o comportamento do LA com o aumento de sua concentração, monitorando as distâncias mínimas (Figuras 6 e 7), entre estas moiéculas, e que concordam com os resultados da RDF da moléculas de água em relação as moléculas da BZC. Essas agregações foram previamente medidas por dispersão de luz em um modelo de schução de membrana, o qual provocam rempimento da membrana, quando sua concentração é crítica.^{*} A análise das simulações da dinámica molecular sugere que o anestênico começa a agregar em cerca de 60 mM (5 moléculas BZC na caixa). Esta simulação foi realizada de 1 g/L a 350 g/L e um aumento para o caráter hidrofóbico foi encontrado na g(r) função de BZC com água.

A RDF de moléculas de água para as moléculas de todas as BZC (Figura 2) mostra uma redução significativa de g(r) para um valor próximo à droga (cerca de 0,6 nm), com o aumento da concentração de beazocatna. Isso significa um aumento de hidrofobicidade que as moléculas do fármaso apresentam ao interagir mais em entre si, enquanto sua interação com a água diminui.



Figure 2. Gráfico da RDF do centro de massa da BZC com o centro de massa das moléculas de ógua. A seta indica aumento da concentração, para cada uma das dinâmicas de 1 a 20 moléculas de BZC em ógua. Com o aumento da concentração e formação de agregados de BZC, ocorre uma diminuição da RDF, indicando uma característica mais hidrofóbica do aglomerado de BZC. Esta redução da RDF é devido a redução da ecpa de hidratação, que cada molécula de BZC tem no seu entorno no aglomerado.



Figure 3: Grófico da RDF de oxighnio da carbonila (no topo) e hidrogênios da amina (no fundo) com centro de massa das moléculas de dqua. As setas indicam o aumento da concentração, para cada uma das dindmicas de 1 a 20 moléculas de BZC em égua. O pico em ambos gráficos no entorno de 0,15 nm a 0,25 nm indica uma provével permanente ligação de hidrogênio, do oatigênio da carbonila com hidrogênios da água e hidrogênios da amina com oatigênios da água. O primeiro e segundo picos correspondem a primeira e segunda capa de hidratação. Como já mencionado da Figura 2 com aumento da concentração de BZC e formação de agregados de BZC, ocorre uma diminsição da RDF, indicando uma característica mais hidrofóbica do agiomerado de BZC. Esta redação da RDF é devido a redação da capa de hidratação, que cada molécula de BZC tem no seu entorno no agiomerado.



Figure 4. Gráfico do valor máximo para a primeira capa: de hidratação - com relação ao centro de massa das moléculas de BZC, correspondendo a primeira volta ao máximo de oxigênio da carbonila, em g (r) versas o mimero de moléculas BZC. A linha tracejada corresponde à função ajustada com coeficiente de correlação de 0,904.



Figure 5. Gráfico do Potencial da Força Média (PMF) do oxigitnio da carbonila com centro de massa das moléculas de água versus concentração BZC. A linha tracejada corresponde a um ajuste exponencial 0,847 descendente.



Figura 6. Grifico da distância minima (nm) do centro de massa entre 1 (uma) molécula de BZC, e o centro de massa de cada uma das outras 15 (quinze) moléculas em função do tempo (ps). Cada linha representa um gráfico da distância do centro de massa de cada uma das 16 (dezesseis) moléculas em relação de outras moléculas na MD. Forma-se no final da dinâmica um agregado de 14 moléculas com diâmetro médio de 1 nm, com duas moléculas fora deste agregado. Tem-se que no entorno de 3800 ps a 4000 ps a formação de um agregado de 15 moléculas e uma fora deste, e após este pequeno período uma delas se separa do agregado e este se mantêm com 14 moléculas no agregado e duas fora deste, e após este pequeno período uma delas se separa do agregado e este se mantêm com 14 moléculas no agregado e duas fora deste, e ambas próximas uma da outra.



Figura 7. Grifico da distância minima (nm) do centro de massa entre 1 (ama) molécula de BZC, e o centro de massa de cada uma das i outras 17 (dezessete) moléculas de BZC em fianção do tempo (ps). Cada linha representa um gráfico da distância do centro de massa de 1 cada uma das 18 moléculas em relação às outras moléculas da MD. Forma-se no final desta dincânica um agregado de 18 moléculas com 1 diámetro médio de 0,5 nm, e nenhuma moléculas fora deste agregado.



Figure 8. Gráfico da distância mínima (nm) entre os hidrogônios H11 e H12 do terminal amina, com os oxigênios das moléculas de água. O pico característico de possíveis ligações de hidrogônio na Figura 3, com valor médio de 0,175 nm, nesta figura, pode ser confirmada, indicando a "provável permanência" de ligação de hidrogênio "fiza" entre os hidrogênios H11 e H12 do terminal amina, com os axigênios das moléculas de água, é independente da quantidade de moléculas de B2C acrescidas na simulação dos agregados.


Figura 9. Gráfico da distância mínima (nm) entre o axigênio O5 carbonila, com os hidrogênios das moléculas de água. O pico característico de possíveis ligações de hidrogênio na Figura 3, com valor médio de 0,155 nm, nesta figura, pode ser confirmada, indicando a "provável permanência" de ligaçõe de hidrogênio "fiza" entre o axigênio O5 carbonila, com os hidrogênios da água, é independente da quantidade de moléculas de BZC acrescidas na simulação dos agregados.



Fignere 10. Representação esquemática da formação de agregados em água na caixa, ilustrundo a morfologia dos diferentes aglomenadas, para 5, 15 e 20 moléculas B2C respectivamente, da esquerda para a direita.

Uma visão refinada da g(r) apenas para os hidrogênios amina e carbonila de oxigênic (Figura 3) indica a dessolvatação para estas regiões como o efeito da ligação hidrogênio no strio dessas porções, no interior do agregado molecular. Podemos ver uma redução acentuada do primeiro pico, seguido de redução consecutiva da RDF, em comparação com a simulação de referência representado por um unica molecula BZC.

A partir dos valores mais alto da região do primeiro pico (0,15 nm para 0,25 nm), para o oxigênio da carbonila, podemos estimar campo de potencial de força média (PMF) para a dessolvatação de benzocatna e formação de agregados. Adicional análise do valor de pico para a dessolvantação da BZC em diferentes concentrações indicaram uma dependência linear (Figura 4). Esta dependência linear, não será observado em concentrações mais elevadas, devido à interação limitada entre as moléculas do farmaço e também, devido à solvatação dos agregados do anestêsico.

Para testar essa hipótese, foi estendida a investigação a maior concentração de BZC, contendo 25, 30 e 40 moléculas de BZC, e estimou-se em PMF versus concentração (Figura 5). Observamos que o comportamento do LA com aumento de sua concentração, indica que PMF ajusta-se por uma curva exponencial em vez de uma função linear.

A razoāvel flutuação observada no ajuste linear, tem sua origem em váries fatores, muitos destes estão relacionades com a forma dos agregados (Figura 10). Podemos notar nas simulações que, em alguns casos, dois pequenos agregados são formados, um grande e outro pequeno, e estes podem variar em cada simulação, sem aparente razão. Além disso, em outres casos, as moléculas de água ficam presas com a droga em partes dentro agregado. Acreditamos que esta flutuação podesia desaparecer quando um tempo maior de dinámica é realizada.

A outra questão é a formação de aglomerados que são modificados, ou seja, o aglomerado venha à ficar instâvel quando está em meio lipofilico? Estas questões só podem ser respondidas quando uma simulação for feita com os agregados próximos de um modelo de membrana, a aossa próxima etapa.

O estudo de bemocratas precisa de atenção especial, pois e o modo de atenção que pode ser diferente devido a seu plia baixo quando comparado, com outros LAs, o que significa que não tem uma forma carregada em condições fisiológicas. O estudo computacional que aqui apresentamos, indica a formação de aglomerados de BZC, quando se aumenta sua concentração, como o era esperado e medido para outros anestesicos. Mostramos que a benzocaina facilmente forma agregados em concentrações elevadas e estes agregados aumentam sua hidrofobicidade com o aumento da concentração. Como efeito colateral, estas moléculas altamente hidrofobicas podem agir como detergentes, comprometendo a integridade das membranss neuronais, causando lesão neural irreversivel.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPERJ Um agradecimento especial ao Professor Michel Loos, pelo apoio à utilização de Gaussian 03.

REFERENCIAS

- 1. Butterworth, J. F.; Strichartz, G. R.; Anesthesiology 1990, 72, 711.
- Hille, B.; J. Gas. Physiol. 1977, 60, 497.
- 3. Wang, G. K.; Quan, C.; Wang, S.; Eur. J. Physiol. 1998, 435, 293.
- 4. Elliott, J. R.; Haydos, D. A.; Hendry, B. M; Pflugers Arch 1987, 409, 596.
- 5. Ragsdale, D. S.; Meyhee, J. C.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A., 1996, 93, 9270.
- 6. Strugala, G. J.; Elsenhans, B.; Forth, W.; Biochem. Pharmacology 2000, 59, 907.
- 7. Wang, G. K.; Quan, C.; Wang, S. Y.; Mol. Pharmacology 1998., 54, 389.
- 0. Lundback, J. A.; Din, P.; Girshman, J.; Hansen, A. J.; Andersen, O. S.; Diochemistry 1995, 35, 5025.
- 9. Kitagawa, N.; Oda, M.; Totoki, T.; Anesthesiology 2004, 100, 962.

- 10. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, acessada em fevereiro 2007.
- 11. Onsager. L.; J. Am. Chem. Soc. 1936, 58, 1486.
- 12. Hohenberg, P.; Kohn, W.; Phys. Rev. B: Condes. Matter Mater. Phys. 1964, 136, 864.
- 13. Kohn, W.; Sham, L. J.; Phys. Rev. A: At, Mod., Opt. Phys. 1965, 140, 1133.
- 14. Becke, A. D.; J. Chem. Phys. 1993, 98, 5648.
- 15. Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G.; Phys. Rev. B: Condes: Matter Mater. Phys. 1988, 37, 785.
- 16. Petersson, G. A.; Allaham, M. A.; J. Chem. Phys. 1991, 94, 6081.
- 17. Petersson, G. A.; Bennett, A.; Tensfeldt, T. G.; Allaham, M. A.; Shirley, W. A.; Mantzaris, J.; J. Chem. Phys. 1938, 89, 2193.
- 18. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Vreven, Jr. T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Ilyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Ciosłowski, J.; Stefanov, B. B.; Lia, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A.; *Gaussian 03 Revision (B.04) Gaussian, Inc., Wallingford, Estados Unidos da América*, 2004.
- Breneman, C. M.; Wiberg, K. B.; J. Comput. Chem. 1990, 11, 361.
- Scott, W. R. P.; Hunenberger, P. H.; Tironi, I. G.; Mark, A. E.; Billeter, S. R.; Fennen, J.; Torda, A. E.; Huber, T.; Kruger, P.; Gunsteren, W. F. van J. Phys. Chem. A 1999, 103, 3596.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Gunsteren, W. F. van; Hermans, J.; Reidel Publishing Company 1981, 331.
- 22. Lindahl, E.; Hess, B.; Spoel, D. van der; J. Mol. Modeling 2001, 7, 306.
- 23. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C.; J. Comput. Phys. 1977, 23, 327.
- 24. Spoel, D. van der; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J.; J. Comput. Cham. 2005, 26, 1701.
- 25. Filipponi, A.; J. Phys.: Cond. Matter 1994, 6, 8415.
- 26. Lyubartsev, A. P.; Laaksonen, A.; Phys. Rev. E: Stat. Nonlinear Soft Matter Phys. 1995, 52, 3730.
- 27. Carley, D. D.; Phys. Rev. 1963, 131, 1406.
- 28. Bamdad, M.; Alavi, S.; Najafi, B.; Keshavarzi, E.; Chem. Phys. 2006, 325, 554.
- 29. Bernardi, R. C.; Gomes, D. E. B.; Pascutti, P. G.; Ito, A. S.; Taft, C. A.; Ota. A. T.; J. J. Quantum Chem. 2007, 107, 1642.
- 30.Garmroodi, A.; Hassan, J.; Yannini Y.; J. Chem. Eng. Data. 2004, 49, 709.
- 31. Peña, M. A.; Reillo, A.; Escalera, B.; Bustamante, P.; Int. J. Pharmaceu. 2006, 321, 155.
- 32. Aguado, E.; Longarte, A.; Alejandro, E.; Fernandez, J. A.; Castaño, F.; J. Phys. Chem. A 2006, 110, 6010.
- 33. Balci, K.; Akyuz, S.; Vib. Spectrosc. 2008, 1.561, 14.
- Mura, P.; Maestrelli, F.; Gonzalez-Rodraguez, M. L.; Michelacci, I.; Ghelardini, C.; Rabasco, A. M.; Eur. J. Pharmaceu. Biopharmaceutics. 2007, 67, 86.
- 35. Czirják, G.; Enyedi, P.; J. Bio. Chem. 2006, 281, 14677.
- Robson, K. J.; Maughan, J. A.; Purcell, S. D.; Petersen, M. J.; Haefner, H. K.; Lowe, L.; J. Am. Acad. Dormatol. 2006, 55, 874.
- 37. Trien Vu, A.; Lockey, R. F.; J. Allergy Clin. Immunol. 2006, 118, 2.
- 38. Bernardi, R. C.; Gomes, D. E. B.; Gobato, R.; Taft, C. A.; Ota, A. T.; Pascutti, P. G.; Mol. Phys. 2009, 107, 1437.
- 39. Quan, C.; Mok, W. M.; Wang, G. K. (J. Biophys. 1996, 70, 94.
- 40. Meeder, T.; Ulbricht, W.; T. Pflugers Arch. 1987, 409, 265.
- 41. Tikhonov, D. B.; Brahova, I.; Zhorov, B. S.; FEBS Lett. 2006, 580, 6027.
- 42. Weiser, T.; Neurosci. Lett. 2006, 395, 179.
- 43. Pinto, L. M. A.; Fraceto, L. F.; Santana, M. H. A.; Pertinhez, T. A.; Oyama Jr., S.; Paula, E.; J. Pharm. Biomed. Anal. 2005, 39, 956.
- 44. Allaboun, H.; Alkhamis, K. A.; Al Jbour, N. D.; Eur. J. Pharmaceu. Biopharmaceutics. 2007, 65, 188.
- 45. Fraceto, L. F.; de Paula, E.; Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2006, 27, 27.
- 46. Pinto, L. M. A.; Yokaichiya, D. K.; Fraceto, L. F.; de Paula, E.; Biophys. Chem. 2000, 87, 213.
- 47. Och, F. M. M. V.; Loveren, H. V; Wolfswinkel, J. C. V.; Machielsen, A. J. C.; Vandebriel, R. J.; Toxicology, 2005, 210, 95.

ANEXO 7.6 – ARTIGO EM FASE FINAL DE PREPARO (HOELZ ET AL.):

The β_1 -adrenoceptor activation mechanism

L. V. B. Hoelz¹, R. C. Bernardi², M. G. Albuquerque¹, J. F. M. da Silva¹, P. G. Pascutti², R. B. de Alencastro¹

LabMMol – Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.
Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

ABSTRACT:

Human β_1 -adrenoceptor (β_1 -AR) is a seven helixes transmembrane protein, member of the large G-protein-coupled receptors superfamily, which has an essential role in the signal transduction pathway. The binding of the agonist to its extracellular receptor leads to a conformational change in the inner portion of the protein, triggering the activation of G proteins and raising the intracellular level of cAMP and Ca²⁺. Despite its importance, at molecular level, the activation mechanism of this protein still unknown. Therefore, using the state of the art molecular modeling tools, we provide in this work a functional human β_1 -AR model equilibrated in a membrane environment showing how the ionic lock mechanism works. We show that differently from the antagonist action, an agonist drug disturbs the protein causing a rotation of the transmembrane helixes. This rotary motion occurs in opposite directions in the inner and outer portion of the β_1 -AR, opening the ionic lock.

Introduction:

The human β_1 -adrenoceptor (β_1 -AR) is an integral membrane protein member of the large Gprotein-coupled receptors (GPCRs) superfamily, which shares a common structural motif of seven transmembrane helixes (7TMS domain), as shown in figure 1 (Wolf, 2008, Pierce, 2002, Vanni, 2009, Warner, 2008, Minneman, 2007, Kobilka and Deupi, 2007, Kobilka, 2008). This receptor is expressed in the heart, where it has an essential role in the regulation of the sympathetic tonus, acting as key intermediary in the signal transduction through the cellular membrane (Brodde et al., 2008). Therefore, activating molecules, *i.e.* agonists as catecholamines, bind to the extracellular receptor, which leads to a conformational change in the inner portion of the protein, resulting in activation of G proteins and a consequent rise in the intracellular level of cAMP and Ca²⁺. The elevation in the concentration of these intracellular messengers increases the heart rate and contractility, leading to a blood pressure raise. However, the binding of an antagonist, such as therapeutic agents for cardiovascular diseases (*i.e.* β blocker), do not cause changes in the protein conformational fold.



Figure 1. Schematic representation of the β_1 -AR and its 7TMS motif.

According to the literature, a common framework to describe the dynamic nature of the receptor activation is the proposal of equilibrium between inactive and active conformational states (Vanni et al., 2009, Kobilka and Deupi, 2007, Samama et al., 1993). However, the exact agonist-receptor interactions involved in the human β_1 -AR activation process still remain unclear (Vanni et al., 2009).

Concerning the primary sequence of the protein, many experiments have identified well conserved regions in the GPRCs superfamily and observed that its disruption could lead to a change in

the equilibrium of the receptors inactive-active state (Kobilka, 2007, Vanni, 2009). The "ionic lock", a salt bridge between a TM3 arginine and a TM6 glutamic acid, is described as the most important of those conserved regions (Kobilka and Depui, 2007, Vanni, 2009).

The crucial contribution of β_1 -AR in the blood pressure regulation by the sympathetic nervous system promotes this receptor to an important therapeutic target for cardiovascular diseases. However, remains technically challenge to study the β_1 -AR structure by X-ray crystallography, since only a few GPCRs structures have been solved. So far, crystallographic data was acquired to bovine rhodopsin coupled to retinal (Palczewski et al., 2000), unliganded bovine opsin (Park et al., 2008), human β_2 -AR in complex with carazolol (Cherezov et al., 2007) and timolol (Hanson et al., 2008), and turkey β_1 -AR in complex with cyanopindolol (Warne et al., 2008).

Since there are insufficient β_1 -AR experimental structural data, computational modeling could expand existing crystallographic information to provide insight to the ligand-bound receptor conformations (Reynolds, Katritch and Abagyan, 2009). In this work, we have investigated the human β_1 -AR activation to understand how the drug binds to the receptor, how the agonists and antagonists affect the protein dynamics and how the ionic lock mechanism works. Therefore, the molecular dynamics (MD) is an ideal method, since it provides a detailed picture of the structural and dynamic changes and an overview about hydrogen and ionic bond formation.

Materials and methods:

Comparative modeling:

The comparative modeling uses topologically equivalent experimental structures and is currently the best computational method for obtaining an accurate model of a protein (Cheng, 2008). In general, comparative modeling involves at least four main steps: (1) identify an suitable template protein (*i.e.*, 3D structure of a protein solved experimentally) for a target protein (*i.e.*, a sequence of a protein with unknown 3D structure); (2) generate an alignment between the template and the target; (3) create a model based on the alignment and the template structure; and (4) evaluate and refine the model. The two key factors to determine the quality of the comparative modeling method are the template structure and the alignment accuracy (Venclovas, 2003).

Amino acid sequence of the human wild-type β_1 -AR (CODE: P08588) was obtained from the EXPASY proteomic server (http://ca.expasy.org/). The template search was performed at the Blast server (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgihttp://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) using the Protein Data Bank (PDB) as database. The T-COFFEE algorithm was used to align the amino-acid sequences of the template proteins and the human β_1 -AR. Consequently, the multiple-alignment file was employed in the construction of the β_1 -AR model by MODELLER 9V7 software (Šali and Blundell, 1993), which employs spatial restriction technique based on the 3D-template structure. This preliminary model was refined in the same software, with optimization protocol modified to nine cycles. The model structural evaluation was carried out by three algorithms in the SAVES server (http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES_3/): the stereochemical quality was analyzed using the PROCHECK software (Laskoswki et al., 1993), and VERIFY 3D (Eisenberg, Lüthy and Bowie, 1996), which determines the compatibility of an atomic model (3D) with its own amino acid sequence

(1D) by assigned a structural class based on its location, environment and comparing the results to good structures.

Construction of the agonist and antagonist- β_l -AR complex:

The agonist (*R*-noradrenaline; NOR) and antagonist (S-propranolol; PRL) (**Figure 2**) had their structures built in the Spartan'06 software (Wavefunction, Inc). The docking of the ligands to the human β_1 -AR model binding site was performed with Moldock software (Thomsen and Christensem, 2006), which uses a heuristic search algorithm that combines differential evolution with a cavity prediction algorithm. The MolDock scoring function used is based on a modified piecewise linear potential (PLP) with new hydrogen bonding and electrostatic terms included. Full description of the algorithm and its reliability compared to other common docking algorithm could be found in reference (Thomsen and Christensen, 2006). The search algorithm, MolDock optimizer, was used with a minimum of 40 runs, the biggest predicted cavity (867.84 Å³) was chosen as binding site, and the parameters setting were: population size = 100; maximum iteration = 2000; scaling factor = 0.50; offspring scheme = scheme 1; termination scheme = variance-based; crossover rate = 0.90.

Figure 2: Structural representation of the ligands. At the top (*R*)-noradrenaline and at the bottom (*S*)-propranolol.

Molecular Dynamics:

The force-field parameters for the drugs were constructed, as usual (10), comparing the atomic distances, bond angles, dihedrals and Lennard-Jones parameters with amino-acids compounds, using the GROMOS96 force field (9). The partial charge of this drugs were calculated employing the method DFT/B3LYP (1-4) with the 6-31-G** basis set (5-6) in Gaussian03 package (7), using the ChelpG scheme to fit the molecular electrostatic potential (8).

The parameters for the POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine) bilayers were obtained based on Dr. Tieleman's work (18). The systems were composed by the protein, approximately 280 POPE and 22.000 water molecules, using the SPC water model (11). Periodic boundary conditions were employed and all the simulations were carried out in the NPT ensemble, using the GROMACS 4 package (19).

The systems were thermodynamically coupled to a 310 K using the Berendsen thermostat (12) and isotropic pressure coupling using the Parrinello-Rahman barostat (13-14). Electrostatic interactions were represented by Particle-Mesh Ewald (PME) with cut-off of 1.1 nm (15), while van der Waals interactions were switched from 0.9 nm to 1.2 nm. All bonds were constrained using the LINCS algorithm (16), the geometry of SPC water molecules were constrained using the SETTLE algorithm (17) and the time-step for integration was set to 2.0 fs. An initial water/membrane relaxation dynamics were carried out during 2.0 ns for system equilibration, keeping the protein position constrained. Production runs were performed during 60 ns.

Results and Discussion:

Determine the structure of a protein is a key to understand its function and to the development of drugs to treat related disease (Fan, 2006). Since the structure of the human β_1 -AR still unknown, we have done a comparative modeling using the proteomic region between Ala40 and Ala398 residues. This part of the proteome includes the entire 7TMS domain, excluding only the intra and extracellular motifs of the receptor which do not interact with the ligands (Warne *et al.*, 2008).

Therefore, to determine the best 3D structure to construct the human β_1 -AR model, we compared the sequence identities and similarities, E-values, crystal resolutions, and structural motifs of proteins from the PDB, using the BLAST server. The selected protein templates (the human β_2 -AR, PDB code: 2RH1; and the turkey β_1 -AR, PDB code: 2VT4) share a sequence identity of 55% and 67% and a similarity of 65% and 76%, respectively, covering almost 100% of the selected part of the human β_1 -AR proteome (Ala40-Ala398) with high statistical significance (E-value = $6e^{-132}$, 2VT4; and E-value = $2e^{-79}$; 2RH1). Furthermore, these two template crystals present the best resolution amongst the GPCR 3D structure present in PDB (2.70; 2VT4; and, 2.40 Å; 2RH1).

The evaluation of the human β_1 -AR model, constructed by MODELLER package, was carried out by PROCHECK, ERRAT, and VERIFY 3D software. The stereochemistry quality was evaluated from the Ramachandran plot, as well as the graphics of the main and side chains parameters, generated by PROCHECK program. This plot shows that 100% of the residues are in the most favored and additional allowed regions, confirming the excellent quality of β_1 -AR model (**Figure 3**).



Figure 3. Ramachandran plot of the human β_1 -AR, the glicine residues are represented by triangles, while the other residues are identified by squares. The red and yellow colors represent the combination of $\phi e \psi$ angles related to the most favorable and additional allowed regions, respectively. The light yellow and white colors are related to generously allowed and disallowed regions. Residues in the most favored regions are 94.7%, while others are in an additional allowed region.

An evaluation of six main-chain proprieties (Ramachandran plot; peptide bound planarity; Bad non-bonded interactions; C_{α} tetrahedral distortion; main-chain hydrogen bond energies; overall G-factor) by comparison with well refined structures at similar resolution was carried using the PROCHECK software. These analyses show that all the main-chain and side-chain proprieties are at standard levels.

Two other analyses were carried out to evaluate the structure quality, the first one, using the ERRAT software, shows that the human β_1 -AR model presents only a few regions with bad contacts, which could be related to the small gap presented in the alignment file, and a high overall quality factor of 88,15%. Then, using the Verify 3D software, we analyzed the compatibility of an atomic model (3D) with its own amino acid sequence (1D). This analysis shows a good compatibility (70.28%) between the human β_1 -AR model and its primary sequence.

This β_1 -AR model was used to carry out a 60ns MD simulation in a water-membrane environment. During this dynamics, we do not observe any significantly change in the protein Rafael C. Bernardi 209

conformational arrangement. The structure had a very good coupling to the membrane and all the transmembrane helix were preserved during the simulation.

Since our model shows a good agreement with the literature and it seems to be stable, we employed a molecular docking strategy to couple the agonist and antagonist drugs to the protein binding site. A previous test was done using the (*S*)-cyanopindolol structure into the human β_1 -AR model, in order to observe whether the active site was maintained in the comparative modeling procedure. The ligand-protein binding site had produced a very high score, similar to those observed experimentally using the turkey β_1 -AR structure. This result was not a surprise, since the human and turkey β_1 -AR had 100% of identity in the binding site.

The coupling between the (*S*)-propranolol to the protein model produced the expected docking poses to the antagonist binding site. This results were similar to those obtained to the (*S*)-cyanopindolol, probably due to its high structural similarity (Baker et al., 2008; Warne et al., 2008). To (*R*)-noradrenaline, an agonist, its docking to the ligand-binding had produced an expected ligands poses. However, the putative hydrogen bonds between the ligand catechol ring hydroxyl moieties and the TM5 serine side chains are longer than the regular hydrogen bond distances (Williams and Ladbury, 2003).

As did to the β_1 -AR model, over 60ns of MD simulations were carried out to relax each of the systems: β_1 -AR + NOR and β_1 -AR + PRL. The conformational arrangement of the protein had no significantly changes during those simulations. To analyze the structure stability in each segment of the protein, we carried out the structure standard deviation floating analysis during the last 30 ns of simulations. The plot (**Figure 4**) shows that there is no major variation in the structure stability, and the most flexible area is the region between the TM5 and TM6 helix, in the intracellular protein domain. It was expected since this region has no detailed structural information in similar proteins, as well as it is a region formed predominantly by random coil secondary structure. Despite the ionic lock opening, that **Rafael C. Bernardi** 210

will be shown soon, in the β_1 -AR + NOR system, there is no major variation in the stability of the secondary structure, which means that the drug does not change the protein fold and is not making the protein unstable.



Figura 4. The plot shows the root mean square standard deviation of the β_1 -AR residues during the 60ns of simulation. At the top, we show an illustrative representation of the protein secondary structure to facilitate the analysis. In black β_1 -AR, red β_1 -AR + NOR and green β_1 -AR + PRL.

To analyze the ionic lock during the dynamics, we monitored the distances between two residues side chain groups, the guanidine of the Arg156 and the carboxyl of the Glu319. As suggested in the literature, **Figure 5** shows the ionic lock closed in the drugless system during the entire MD simulation. Concerning the drug activity, the plot shows that (*S*)-propranolol also keeps the ionic lock closed and (*R*)-noradrenaline opens it, which were already expected. When opened, as represented in the **Figure 6**, the distance between the guanidine nitrogen and the carboxylate oxygen is approximately 1.5 nm. In this conformation, the TM3 and TM6 are rotated, which increases the water solvation in the protein inner portion.



Figure 5. The Plot represents the minimum distance between the guanidine group of the Arg156 side chain and the carboxylate group of the Glu319 side chain, in each system. In black β_1 -AR, red β_1 -AR + NOR and green β_1 -AR + PRL.

To understand the protein movement that leads to the ionic lock opening, we analyzed if the (R)-noradrenaline changes the electrostatic surface of the protein. We had plot the electrostatic surface of the β_1 -AR in each different system, which do not show major variations in the surface indicating that this is not the major mechanism of the ionic lock (data not show).



Figure 6. Illustration of the β_1 -AR in the closed (black) and opened (red) conformation of the ionic lock. The opened conformation was caused by the binding of the (*R*)-noradrenaline (yellow) to the β_1 -AR model.

Using the Dynamite software (20), a web server based upon several other software packages (21 -23), we analyzed the protein motion during the β_1 -AR + NOR molecular dynamics trajectory (**Figure 7A**). The analysis shows that the combined movements of the transmembrane helixes are opposites in each side of the protein and they have different intensities. From the intracellular point of view, the intensity of the movement of the extracellular portion in the clockwise direction is greater than the counter clockwise movement of the inner portion of the protein.



Figure 7. Representation of the principal collective motion of the β_1 -AR, using the Dynamite porcupine scheme. A: entire protein motion with an illustrative view of the torsion of the transmembrane helixes; **B**: representation of the protein surface and the TM3 and TM6 position. **C**: TM3 and TM6 motion. **D**: the ionic lock and the TM3 and TM6 motion. In green, we show the TM6 helix and its Glu319 residue, in yellow the TM3 helix and its Arg156 residue, in blue the porcupine representation showing the motion direction and relative amplitude.

When we analyzed the TM3 and TM6 movements, we observed that the motions of these two helixes are leading to a disruption of the ionic lock (**Figure 7**). The analysis shows that the central portions of the helixes are not having a significant movement, and the opening of the ionic lock is related to the transmembrane helixes torsion caused by the agonist bind in the outer portion of the protein.

Conclusions:

The lack of structural information of transmembrane proteins is a remarkable challenge in the knowledge of those mechanisms. Even class A GPCRs proteins, as the β_1 -AR, which are of overriding importance in the signal transduction through the cell membrane, do not have detailed information of its action at molecular level in the literature. Experiments have indicated that the activation of class A GPCRs could involve a contraction of the TM helixes at the extracellular receptor side, resulting from rotational and translational movements of helixes TM4, TM5, TM6, and TM7 (Gouldson et al., 2004).

Overall, we provide in this work a functional human β_1 -AR model equilibrated in the membrane environment, showing how the ionic lock mechanism works. From the structure, we conclude, in agreement with a plethora of experimental findings, that the β_1 -AR activity involves its 7TMS rotation. The binding of antagonist drugs does not change the structure of the protein, neither their state, but protects the binding of another drug in the protein binding site, keeping the ionic lock closed. Instead, the agonist, when binding to its site in the outer portion of the protein, disturbs this region causing a huge rotation in the 7TMS, which occurs in opposite directions in the inner and outer portion of the β_1 -AR. These rotation movements are common in transmembrane helixes protein (*i.e.* ionic channels) and it opens the ionic lock allowing the G protein activation.

Acknowledgements:

We thank Pedro Loureiro, Juliana Passipieri and Werner Treptow for useful discussions. We thank Carlton A. Taft for useful help in the quantum mechanical calculations. Our research support came mostly from the Brazilian agencies: CNPq, CAPES and FAPERJ.

References:

- 1. P. Hohenberg and W. Kohn. Inhomogeneous electron gas. Physical Review B, 136(3B):B864, 1964.
- 2. W. Kohn and L. J. Sham. Self-consistent equations including exchange and correlation e ects. Physical Review, 140(4A):1133, 1965.
- C. T. Lee, W. T. Yang, and R. G. Parr. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electrondensity. Physical Review B, 37(2):785-789, 1988.
- 4. A. D. Becke. Density-functional thermochemistry .3. the role of exact exchange. Journal Of Chemical Physics, 98(7):5648-5652, 1993.
- 5. G. A. Petersson, A. Bennett, T. G. Tensfeldt, M. A. Allaham, W. A. Shirley, and J. Mantzaris. A complete basis set model chemistry .1. the total energies of closed-shell atoms and hydrides of the 1st-row elements. Journal Of Chemical Physics, 89(4):2193-2218, 1988.
- G. A. Petersson and M. A. Allaham. A complete basis set model chemistry .2. open-shell systems and the total energies of the 1st-row atoms. Journal of Chemical Physics, 94(9):6081-6090, 1991.
- M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Cli ord, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople. Gaussian 03, Revision B.04, 2004. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- 8. C. M. Breneman and K. B. Wiberg. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials the need for high sampling density in form amide conformational analysis. Journal of Computational Chemistry, 11(3):361-373, 1990.
- 9. W.R.P. Scott, P.H. Hunenberger, I.G. Tironi, A.E. Mark, S.R. Billeter, J. Fennen, A.E. Torda, T. Huber, P. Kruger, and W.F. van Gunsteren. The gromos biomolecular simulation program package. Journal of Physical Chemistry A, 103(19):3596-3607, 1999.
- R. C. Bernardi, D. E. B. Gomes, P. G. Pascutti, A. S. Ito, C. A. Taft, and A. T. Ota. Water solvent and local anesthetics: A computational study. International Journal of Quantum Chemistry, 107(7):1642-1649, 2007.
- 11. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, and J. Hermans. Intermolecular Forces, chapter Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration, pages 331-342. Reidel Publishing Company, 1981.
- 12. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. The Journal of Chemical Physics, 81(8):3684-3690, 1984.
- 13. S. Nose and M. L. Klein. Constant pressure molecular-dynamics for molecular-systems. Molecular Physics, 50(5):1055-1076, 1983.
- M. Parrinello and A. Rahman. Polymorphic transitions in single-crystals a new molecular dynamics method. Journal of Applied Physics, 52(12):7182-7190, 1981.
- T. Darden, D. York, and L. Pedersen. Particle mesh ewald an n.log(n) method for ewald sums in large systems. Journal of Chemical Physics, 98(12):10089-10092, 1993.

- B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, and J. G. E. M. Fraaije. Lincs: A linear constraint solver for molecular simulations. Journal of Computational Chemistry, 18(12):1463-1472, September 1997.
- 17. S. Miyamoto and P. A. Kollman. Settle an analytical version of the shake and rattle algorithm for rigid water models. Journal of Computational Chemistry, 13(8):952-962, 1992.
- Tieleman, D. P., and H. J. C. Berendsen. 1998. A molecular dynamics study of the pores formed by *Escherichia coli* OmpF porin in a fully hydrated palmitoyloleoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophys. J.* 74:2786–2801.
- 19. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E (2008). Gromacs 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. Journal of Chemical Theory and Computation 4: 435–447.
- 20. Barrett C.P., Hall B.A, Noble, M.E.M. Dynamite: A Simple Way to Gain Insight into Protein Motions *Acta Crystallographica D* Vol 60 Issue 12-1 pp2280-2287
- 21. Lindahl E, Hess B, Spoel Dvd: GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. J. Mol. Mod. 2001, 7:306-317.
- 22. de Groot BL, van Aalten DM, Scheek RM, Amadei A, Vriend G, Berendsen HJ: Prediction of protein conformational freedom from distance constraints. *Proteins* 1997, 29:240-251.
- 23. Humphrey W, Dalke A, Schulten K: VMD: visual molecular dynamics. J Mol Graph 1996, 14:33-38, 27-38

Study of the free energy profiles of ethanol as a drug vehicle for small molecules.

Bernardi, R. C., Treptow, W., Klein, M. L., et al.

Abstract:

The cell membrane behaves as a most important barrier for small peptides and drugs that needs to act in the inner portion of the cell. Therefore, it is a quite regular that changes in the membrane structure and permeability are necessary. To understand such process, we have used the ethanol molecule in a water membrane interface, once it is known that this drug works to increase the partition of other molecules in the interface as well as their own partition. Molecular Dynamics simulations are performed, using the Adiabatic Biasing Force method to calculate the free energy profile of ethanol in a reaction axis from the water to the membrane. As expected, the free energy profile of this alcohol, at different concentrations, shows that the highest concentration have the small free energy barrier to the drug cross the interface. Studying the system and isolating the hypothesis, we saw that increasing the area per lipid and consequently increasing the solvation of the membrane, the bilayer turn to be more permeable to amphiphilic molecules, because of the electrostatic shield in the lipid polar head and the increase of the tails fluidity.

Introduction:

The transport of molecules through the cell membrane is very important for many biological processes. Several hormones, small peptides and other classes of molecules and drugs, cross the membrane without the assistance of a protein or enzyme that assists such process. The diffusion of such molecules a complex process because the cell is membrane is an important barrier. A statistical mechanics insight of the problem is that, in order to penetrate the cell, alone or with the assistance of some other substance, must change their free energy partition on water-lipid interface. Consequently, they must change some structural properties of the lipid bilayer.

The membrane is a remarkable obstacle due to its hydrophobic core and polar head, which also provides an extraordinary ambient for amphiphilic molecules, like alcohol and some drugs, such as local anesthetics. The hydrophobic portion of these drugs interacts with the lipid tails, while the hydrophilic **Rafael C. Bernardi** portion interacts with the polar head groups, aligning these small molecules with the interface perpendicular axes (Dickey & Faller, 2007) (Pedersen, Peters, & Westh, 2007) (Aagaard, Kristensen, & Westh, 2006). Perhaps for that reason, there are many studies concerning the interaction between small molecules and membranes or membrane proteins, however none of them study this problem with statistical mechanics tools.

In this work we chose the ethanol molecule as a test, since it is well known that it changes the permeability of the membrane to other drugs as well as their own permeability. To understand how this process occurs, we have used the ABF method in order to obtain the free energy profile at different concentrations of the ethanol molecule penetrating the membrane. The alcoholmembrane system is good for this study because it has been quite studied by other experiments, which leads us to a better understanding of the process. Also a study

about the behavior of the alcohol molecule in water, as well as in membranes, helps us since several studies of the behavior of the molecule of alcohol in water were made, both theoretical and experimental (Leonenko, et al., 2004). Some of these works are distinguished by an excellent analysis on details of the interaction, such as in the study about of methanol-water interaction performed by Bako (Bako, et al., 2008).

Regarding the study of membrane, an effect on lateral pressure was seen in several works. They showed that the increase of the alcohol concentration reduces the surface tensions at the head-group/solvent and headgroup/tail-group interfaces, as well as the lateral pressures in the head-group and tailgroup regions (Frischknecht, et al., 2006) (Terama, et al., 2008). Also it was suggested that changes in the local pressure across a membrane would induce changes in membrane proteins, like ion channels (Terama, et al., 2008) (Cantor, 1997) (Cantor, 1997). In addition to an increase in the lateral pressure, several studies, theoretical and experimental, have shown an increase in the lipid area up to 30% when the ethanol concentration is over 3.0 M, however the information is contradictory due to the variation in the membrane thickness. Some studies suggest that there are no major variations in the membrane thickness while others found significant variations (Dickey, et al., {2005}) (Ly, et al., 2004) (Leonenko, et al., 2004).

Analysis using FTIR and NMR spectroscopic shows that alcohol has a nonstereospecific binding capacity for membrane surface molecules and such binding occurs at sites that are otherwise occupied by hydrogenbonded water (Klemm, 1998). Other studies, theoretical and experimental, shows hydrogen bonds between the ethanol and the polar head groups of the lipids, but, due to their amphiphilic characteristic, the ethanol has a higher probability of being attached in the region just below the membrane polar head (Patra, et al., 2006) (Feller, et al., 2002). For that reason, it has been shown an increase of the

fluidity of the membrane lipid tails, as illustrated by Pedersen (Pedersen, et al., 2007) in a theoretical study of 1-hexanol in DMPC membranes.

Ethanol as drug vehicle:

These changes in the membrane fluidity could explain the use of ethanol as a drug vehicle. To test what happens to the free energy profile of a drug in two different concentrations of ethanol, we carried out similar calculations for the local anesthetic benzocaine (BZC). This drug was chosen because it is well known that its most important site of action of drug is in the inner portion of sodium channels. Therefore, these molecules must to cross the membrane, although it is known that its amphiphilic character makes it favorable to be attached in water-membrane interface (Bernardi, et al., 2009).

Through experimental results using human and pig skin and local anesthetics, Lee showed that ethanol appeared to be able to increase drug flux only by improving drug solubility (Lee, et al., 2006). Ethanol as vehicle Rafael C. Bernardi for local anesthetic benzocaine was studied in at least two works (Chen, et al., 1996) (Wang, et al., 2000), that showed that the effect of ethanol concentration on benzocaine membrane solubility appears to be much smaller than its effect on the diffusivity. The authors suggested in this study that the relationship between diffusivity and membrane swelling is in excellent agreement with the general free volume theory. Wang showed that with the knowledge of the dependence of benzocaine and ethanol diffusivities on ethanol activity, the activity profile of ethanol across the membrane can be calculated, and the effective diffusivity of benzocaine can then be predicted (Wang, et al., 2000).

Our work aims to combine structural and thermodynamics data, which should provide a successful approach to elucidate membrane–solute interrelationships. Some studies have performed experimental analysis of changes in free-energy of membrane partitioning for homologous series of solutes (Seeman, 1972) (Rowe, et al., 1998), but we are not aware that the free energy profile has been studied. Therefore, we performed calculations molecular dynamics of the ethanolof (1-stearoyl-2-oleoylmembrane phosphatidylcholine - SOPC) system and also in the benzocaine-ethanol-membrane system. The molecular dynamics is an ideal method to study these systems, since it provides a detailed picture of the structural and dynamic changes overview about hydrogen bond and an formation. Furthermore we can set test experiments changing some interactions, such as electrostatics, which is impossible to be done experimentally.

Methods:

The simulations in this work were performed with the NAMD molecular dynamics package, with the implementation of the ABF module. The CHARMM27 force field was used to describe all systems. The water model used was TIP3P, the membrane was SOPC and the parameters for ethanol and for benzocaine were obtained from ab-initio calculations B3LYP/6-31G ****** with partial charges calculated by the ChelpG scheme.

For all simulations the temperature was maintained at 300 K using Langevin dynamics temperature pressure and coupling. to Electrostatic interactions were treated with the PME method and the motion equations were integrated using the r-RESPA multiple time step scheme to upgrade the van der Waals interactions for every 2 steps and electrostatics every 4 steps, truncating the interactions to 11.0 Å. The step of integration was fixed to 1.0 fs for all simulations performed in this work. Initial 20 ns simulations were performed to balance the dynamics of the system before using the ABF.

Results and Discussion:

Using molecular dynamics methods near the equilibrium, specifically using Adaptative Biasing Force (ABF), we can acquire the free energy profile for an ethanol molecule in the water-membrane interface, in different concentrations of this alcohol. Therefore, a reaction coordinate that extends from the reference molecule to the membrane center was set on the Z axis, perpendicular to the membrane surface plane. This coordinate starts in the -33.0 Å position, outside the membrane to the -3.0 Å position near to the membrane center, accumulating the average of the force value each 0.1 Å.



Figure 1:

The free energy profile for different concentrations of ethanol molecule penetrating a lipid bilayer is shown in the figure 1. It is easy to see in this plot that different concentrations of ethanol have significant differences in the free energy profile. At lower concentration, 17mM, we have just one ethanol molecule in the system. In this case, there is a first 2

Rafael C. Bernardi

kcal/mol barrier just above the polar head region of the lipid, more specifically in the PO₄ group, as shows the distribution in the figure 1. When we increase the alcohol concentration to 650mM, the first barrier disappears almost entirely. Therefore, there are no more challenges to the ethanol molecule to go to their minimal free energy position, just below the PO₄ region, close to the ester region of the tail. Some studies describe this region just below the polar head as the preferred site for ethanol molecules (Patra, et al., 2006) (Dickey, et al., 2007).

In addition to this first barrier change, the ethanol also affects the size of the next one to the central region of the membrane. This reduction have the same order of magnitude of the thermal energy (k_BT), which helps the molecule to more easily cross the membrane, entering the cell.



Figure 2:

Ethanol effect on benzocaine:

To analyze what happens with the free energy profile of another molecule in high ethanol concentration, we have done the same calculation for the local anesthetic benzocaine. In these calculations we evaluate the free energy profile of a single benzocaine in water membrane system and in the same system with 650 mM of ethanol (figure 2). We can see that the ethanol makes the minimum energy fade away in the region just below the lipid polar head. However, in the region preceding the lipid head, a small barrier is formed to the LA penetrates the membrane. As we can see, the minimum free energy value is found in the same region for the local anesthetics and Rafael C. Bernardi

ethanol, which may indicate a competition of these two molecules for the same site (figure 3). These results are not surprising since both molecules are amphiphilic and this region of the membrane is known to be a great environment for this type of molecule.

Why the free energy profile is affected by the alcohol:

The increasing in the permeability of lipid bilayer is probably due to its swelling, causing an increase of the area per lipid, as shown by some other reference. Our results are showing that the number of water molecules around the membrane is higher in the simulations with major ethanol concentrations, but our results do not indicate a greater penetration of the solvent in the membrane. This increase in the number of molecules is caused by the increase in the membrane-water interface. Using the Radial Distribution Function, we concluded that varying the concentration of ethanol to a very high value, such as 8M, are in a radius of 5A around the lipid, there are 1.7 more water molecules per

lipid, an increase of 30% in the number of water molecules. Even for a small change in the ethanol concentration, such as 650mM, there is an increase in about 3% in the number of water molecules in the same radius.

In addition, the analysis of the number of hydrogen bonds along our reaction coordinate, and also the pair distribution along this coordinate, gives us a better understanding about the reaction. In different ethanol concentration there is a small difference in the number of hydrogen bonds between ethanol and membrane. We detected a small displacement of the hydrogen bonds going to the internal portion of the membrane.

The interaction between ethanol and the polar head is notable and the changes in this interaction could disrupt the ethanol free energy profile. Due to merge of ethanol molecules in the lipid membrane, all the system structure is disturbed and it does facilitate the penetration of other molecules and the ethanol as well.



Figure 3:

All these results show a free energy profile which agrees with the data already presented by other authors in both experimental and theoretical works. However, we don't know a study that has elucidate what happens at each stage of the reaction coordinate in order to obtain this increase in the membrane permeability.

Using computational modeling we can run different simulations, creating situations that cannot be done experimentally. To better understand the free energy profile, we carried out new simulations with some small differences in the initial default. For the system with only one ethanol molecule, we changed the value of the area per lipid in the calculation, artificially increasing the value found in the calculation with high concentrations of ethanol. Also, for the same system, we changed the values of the atomic charges of ethanol, given the ethanol ten times less powerful electrostatic interactions with other molecules. These two experiments were carried out trying to filter the change in the free energy profile in the high ethanol concentration.

Artificially increased area:



Figure 4:

In order to try to reproduce the 650mM and 8M ethanol free energy profile without the presence of this alcohol we have increased the area of our simulation box, run a system where the X and Y dimensions of the box are kept

Rafael C. Bernardi

constant while the Z dimension remains attached to pressure. The area was kept constant at two values, with the 650 mM of alcohol area value and the other with the 8M of ethanol value. Note that the increase in the area affects the profile, but it seems that there is a limit on how much of the first energy barrier is affected by this bigger area (figure 4). The barrier of the internal region of the membrane, the lipid tails, appears to have a more significant reduction. The energy variation, from the minimum to the highest point of the fuction, is approximately 2.25 Kcal/mol for the constant area experiment, and less than 2.0 kcal / mol for the one with 8M of ethanol. While in the area that mimics the concentration 650mM we have the barrier of the interior value is approximately 2.75 kcal / mol to 3.5 kcal / mol in the simulation with ethanol.

Artificially decreased electrostatic interactions:



Figure 5:

To study the changes in the free energy profile as an electrostatic shield, we have multiplied the value of the partial charges of the ethanol atoms by 0.1, allowing us to have only 10% of the electrostatic interactions of the ethanol molecule. Consequently we observed in Figure 5, that the energy barrier inside the membrane is completely destroyed by the lack of electrostatic interactions. This is unwanted to elucidate the profile that we have with ethanol solutions, but the first energy barrier is also canceled by the effect of the electrostatic shielding and, as in the simulation with 8M of ethanol, there is no energy barrier to cross the region of the membrane polar head. This Rafael C. Bernardi

indicates that there is one region of the profile where the electrostatic shielding effect is vital to the change in the free energy profile.

Conclusions:

The effects of ethanol on the permeability of the membrane are well known and easy to be observed with the methodology applied in this work. The ethanol in the membrane increases its permeability as well as increase the permeation of other amphiphilic molecules, changing membrane properties. Carrying out simulations with increased area and electrostatic shielding, we have observed that they could be the effects that alcohol causes on the membrane.

An electrostatic shielding due to the accumulation of molecules in the polar head region causes a greater effortlessness of crossing the same region of the phosphoric region, the minimum of energy after this region is reduced by increasing the area per lipid. This effect increases the fluidity of the lipid tails, and consequently reduces the barrier in the center of the membrane facilitating the penetration of other molecules, as the diagram in Figure 6.



Figure 6:

The model presented by analysis of the free energy profile suggests a universal mechanism for increasing the self-partition of amphiphilic molecules in biological membranes. The mechanism of operation of this model is important to understand assisted permeation in membrane, as molecules that alone will not permeate the bilayer and require that the membrane shielding be reduced.

References:

Bako Imre [et al.] Water-methanol mixtures: topology of hydrogen bonded network. [Journal] // Phys Chem Chem Phys. - 2008. - Vol. 10. - pp. 5004-5011.

Bernardi R. C. [et al.] Molecular dynamics study of biomembrane/local anesthetics interactions [Journal] // Molecular Physics. - [s.l.] : Taylor \& Francis Ltd, 2009. - Vol. 107. - pp. 1437-1443.

Cantor R. S. Lateral pressures in cell membranes: A mechanism for modulation of protein function [Journal] // Journal Of Physical Chemistry B. - 1997. - Vol. 101. - pp. 1723-1725.

Cantor R. S. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. [Journal] // Biochemistry. - 1997. - Vol. 36. - pp. 2339-2344.

Chen S. X. and Lostritto R. T. Diffusion of benzocaine in poly(ethylenevinyl acetate) membranes: Effects of vehicle ethanol concentration and membrane vinyl acetate content [Journal] // Journal Of Controlled Release. -1996. - Vol. 38. - pp. 185-191.

Dickey Allison N and Faller Roland How alcohol chain-length and concentration modulate hydrogen bond formation in a lipid bilayer. [Journal] // Biophys J. - 2007. - Vol. 92. - pp. 2366-2376.

Dickey AN and Faller R {Investigating interactions of biomembranes and alcohols: A multiscale approach} [Journal] // {JOURNAL OF POLYMER SCIENCE PART B-POLYMER PHYSICS}. - {2005}. - Vol. {43}. - pp. {1025-1032}.

Feller Scott E [et al.] Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy crossrelaxation rates and ethanol distribution across membranes. [Journal] // Biophys J. - 2002. - Vol. 82. - pp. 1396-1404.

Frischknecht Amalie L and Douglas Laura J Alcohols reduce lateral membrane pressures: predictions from molecular theory. [Journal] // Biophys J. - 2006. - Vol. 91. - pp. 4081-4090.

Klemm W. R. Biological water and its role in the effects of alcohol. [Journal] // Alcohol. - 1998. - Vol. 15. - pp. 249-267. Lee Philip J [et al.] Evaluation of chemical enhancers in the transdermal delivery of lidocaine. [Journal] // Int J Pharm. - 2006. - Vol. 308. - pp. 33-39.

Leonenko Z. V. and Cramb D. T. Revisiting lipid - general anesthetic interactions (I): Thinned domain formation in supported planar bilayers induced by halothane and ethanol [Journal] // Canadian Journal Of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie. - 2004. - Vol. 82. - pp. 1128-1138.

Ly Hung V and Longo Marjorie L The influence of short-chain alcohols on interfacial tension, mechanical properties, area/molecule, and permeability of fluid lipid bilayers. [Journal] // Biophys J. - 2004. - Vol. 87. - pp. 1013-1033.

Patra Michael [et al.] Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. [Journal] // Biophys J. - 2006. - Vol. 90. - pp. 1121-1135.

Pedersen Ulf R, Peters Günther H and Westh Peter Molecular packing in 1-hexanol-DMPC bilayers studied by molecular dynamics simulation. [Journal] // Biophys Chem. - 2007. - Vol. 125. - pp. 104-111.

Rowe E. S. [et al.] Thermodynamics of membrane partitioning for a series of n-alcohols determined by titration calorimetry: role of hydrophobic effects. [Journal] // Biochemistry. - 1998. - Vol. 37. - pp. 2430-2440.

Seeman P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. [Journal] // Pharmacol Rev. - 1972. - Vol. 24. - pp. 583-655.

Terama Emma [et al.] Influence of ethanol on lipid membranes: from lateral pressure profiles to dynamics and partitioning. [Journal] // J Phys Chem B. - 2008. - Vol. 112. - pp. 4131-4139.

Wang D. M. [et al.] Permeation of drug and swelling agent through polymeric membranes [Journal] // Aiche Journal. - 2000. - Vol. 46. - pp. 2383-2394.

ANEXO 7.8 – RESUMO DE TRABALHO SENDO ESCRITO (MENDES ET AL.):

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE FUSÃO DE FLAVIVÍRUS COM MODELOS BIOMIMÉTICOS DE MEMBRANA

¹MENDES,Y.S.; ¹ALVES,N.S.; ¹SOUZA,T.L.F.; ¹SOUSA Jr,I.P.; ¹BIANCONI,M.L.; ²BERNARDI,R.C.; ²PASCUTTI,P.G.; ¹SILVA,J.L; ¹GOMES,A.M.O. & ¹OLIVEIRA,A.C.

¹Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, ²Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Os *Flavivírus* são responsáveis por causar doenças de grande impacto global, como Febre Amarela, Dengue e Febre do Oeste do Nilo. Estes arbovírus entram nas células por endocitose, onde as proteínas de envelope sofrem uma alteração conformacional e expõem um peptídeo de fusão (PF), que se insere dentro de uma membrana alvo e induz o processo de fusão.

Embora este mecanismo geral da fusão seja bem aceito, o modo pelo qual os PFs de *Flavivírus* executam este papel permanece desconhecido. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o grau de interação de peptídeos de fusão de *Flavivírus* com modelos biomiméticos de membrana. As propriedades de interação de dois PFs de *Flavivírus* foram estudadas através de metodologias biofísicas, como espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, calorimetria e dinâmica molecular.

Os resultados indicam que ambos os peptídeos foram capazes de interagir com diferentes modelos de micelas e membranas, induzindo o processo de desmicelização e alterando a fluidez da membrana. O aumento da força iônica induz a perda da

contribuição entálpica em todas as temperaturas analisadas, apresentando-se como um processo endotérmico e entropicamente favorecido.



Figura 1: Ilustração da Dinâmica Molecular do peptídeo de fusão em uma mebrana de POPE. A esquerda o peptídeo Wild Type e a direita o mutante.

Em solução, os peptídeos exibem essencialmente uma conformação randômica, entretanto, na presença de membranas, os peptídeos apresentaram uma estrutura em dobra mais estável. A caracterização destas interações pode ajudar a compreender os processos moleculares que levam à desestabilização de membranas, importante para o mecanismo de fusão. Além disso, para identificar moléculas que inibam especificamente etapas cruciais do ciclo de infecção destes vírus, é necessário conhecer detalhes bioquímicos e caracterizar estruturalmente as proteínas virais essenciais neste processo.

ANEXO 7.9– RESUMO DE TRABALHO EM ANDAMENTO:

Estudo de α-hélices polares em membranas biológicas.

Em colaboração com o grupo do Prof. Sérgio Ferreira do Instituto de Bioquímica Médica temos trabalhado na análise de α–hélices transmembranares que apresentam uma polaridade e estariam relacionadas ao mal de Alzheimer. Neste estudo mostramos que estas hélices, sentem a presença do potencial de membrana, se deslocando na bicamada de acordo com este potencial.



Figura 1: Posição do C_{α} da ILE no eixo z, perpendicular ao plano da superfície da membrana com potencial de 60mV (preto) e –60mV (vermelho). A origem do eixo de coordenadas esta localizada no centro da membrana. A média dos valores indica um deslocamento de 2.5 Å entre os valores dos dois potenciais. Os valores foram obtidos nos últimos 350 ns de dinâmica. A simulação completa foi realizada por 700 ns, sendo que os primeiros 200 ns foram utilizados para relaxar o sistema sem potencial de membrana e os 150 ns seguintes para relaxar o sistema com os potenciais de -60mV e 60mV.

Acompanhando um átomo de referência, no caso um C_{α} de um resíduo de ILE na região central da α -hélice, vimos que existe um grande deslocamento da mesma dentro da membrana, como ilustrado no gráfico da Figura 1. Este deslocamento pode influenciar o ponto de clivagem da hélice por uma enzima que trabalha nesta região transmembranar, o que poderia gerar clivagens em pontos errados. Estas clivagens poderiam estar levando a proteína clivada a formar fibras que seriam responsáveis pela doença de Alzheimer.
ANEXO 7.10 – RESUMO DE TRABALHO EM ANDAMENTO:

The free-energy profile of a fullerene molecule crossing a bio-membrane.

Fullerenes are a variety of molecules composed just for carbons. The buckministerfullerene, also know as buckyball is the most famous component of this family of molecules. It is also the most common in terms of natural occurrence, as it can often be found in soot. The biological importance of this molecule have been studied in the last few years, proving that this molecule can interact with some proteins, enzymes and some other molecules inside the cell. To that, the buckyball needs to cross the biological membrane, what is very complicated once this lipid bilayer is the biggest barrier for any molecule that needs an exchange of media.

Using molecular dynamics methods near to the equilibrium, specifically using Adaptative Biasing Force (ABF), we can get the free energy profile for a buckminsterfullerene (C_{60}) molecule in the water / bio-membrane interface.

Introduction:

Fullerene systems, as well as other types of carbon nanoparticles, are promising candidates for many medical technologies. It have been discussed the use of those molecules in process such as drug delivery, DNA cleavage, inhibition of HIV-protease and other enzymes, photochemistry therapy and a bunch of different systems.



Figure 1: Illustration of the interaction of fullerene with stearoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (SOPC) membrane, performed to obtain the fullerene penetrating a membrane free-energy profile.

Since the membrane is a remarkable obstacle due to its hydrophobic core and polar head, understanding the fullerene behavior in biological membranes is of paramount importance, once this molecule have been proposed to be used as drug vehicle and its largely use could have environmental implications.

In this work we have used molecular dynamics methods near equilibrium, in particular the Adaptative Biasing Force (ABF) method, from which we determine the free energy profile for a buckminsterfullerene (C60) molecule in the water / bio-membrane interface.

Methods:

The simulations in this work were performed with the NAMD molecular dynamics package, with the implementation of the ABF module. The CHARMM27 force field was used to describe all systems. The water model used was TIP3P, the membrane was SOPC and the parameters for fullerene were obtained from ab-initio calculations B3LYP/6-31G ** with partial charges calculated by the ChelpG scheme.

For all simulations the temperature was maintained at 300 K using Langevin dynamics to pressure and temperature coupling. Electrostatic interactions were treated with the PME method and the motion equations were integrated using the r-RESPA multiple time step scheme to upgrade the van der Waals interactions for every 2 steps and electrostatics every 4 steps, truncating the interactions to 11.0 Å. The step of integration was fixed to 2.0 fs for all simulations performed in this work. Initial 2.0 ns simulations were performed to balance the dynamics of the system before using the ABF.

First Results:

The free-energy profile for a fullerene molecule penetrating a lipid bilayer is shown in Figure 2. The plot shows that there is no energy barrier inside the membrane, wich was expected since the fullerene is very hydrophobic. The graphic shows a very deep energy minimum in the lipid tail region, reaching approximately -18 Kcal/mol.

The properties shown by the fullerene free-energy profile indicates that carbon nanoparticles composed exclusively of carbon may be an excellent vehicle to cross the polar region of biological membranes. However, a energy well as deep as shown in the Figure 2 indicates that pure fullerenes could not leave the central region of the lipid bilayer. The use of this type of molecule in drug delivery, as a carrier for hydrophilic molecules, or even functionalized fullerene structures, seems to be a promising tool in the design of new drugs.



Figure 2: Potential of mean force (PMF) of fullerene as a function of its distance from the central plane of the lipid bilayer.

Perspectives:

Fullerenes are entirely insoluble in water, but suitable functionalization makes this molecules soluble. Studies on water-soluble fullerene derivatives led to the discovery of the interaction of organo-fullerenes with DNA, proteins, and living cells. A functionalized fullerene, or even a carbon nanotube, could have special characteristics that guide it to specific cells. It could be very useful to bring drugs or other types of molecules inside the cell.

We are now starting to study the free-energy profile of fullerenes behavior as a carrier of hydrophilic drugs that must to cross the cell membrane. We are trying to understand if the relationship between the fullerene hydrophobicity is stabilized by the drug hydrophilicity. We aim to create a fullerene derivate that has a free-energy profile with no barrier or wells.

ANEXO 7.11 – PROJETO DE TRABALHO EM ANDAMENTO – PÓS-DOUTORADO:

Análise das Ligações Intermoleculares em Cadeias de Celulose – Desenvolvimento de uma Possível Ferramenta para Facilitar as Interações Celulase-Substrato.

Devido à constante busca de novas matrizes energéticas, especialmente com o possível fim das reservas mundiais de petróleo cujas explorações são economicamente viáveis, a pesquisa para produção de combustíveis renováveis vem se destacando. No Brasil, o etanol proveniente da cana-de-açúcar já vem sendo utilizado com bastante sucesso. Porém, como apenas o líquido da cana-de-açúcar é aproveitado, uma grande quantidade de resíduos, até então inúteis, é deixada.

Este material é uma enorme fonte de biomassa para produção de combustíveis, conhecidos como biocombustíveis de segunda geração. No entanto, o acesso à celulose (fonte de energia) pelas celulases (enzimas que hidrolisam a celulose) é fortemente influenciado pelo processo de recalcitrância, devido às estruturas da parede celular e da estrutura cristalina da celulose, que dificultam o acesso da enzima ao substrato. A estrutura cristalina das fibras de celulose já é por si um grande obstáculo, visto que alguns tipos de celulases não têm atividade contra o substrato nesta forma.

Diversos estudos estruturais destacaram a importância de uma rede de ligações hidrogênio entre as fibras na estabilização da mesma. Faz-se clara a necessidade do entendimento desse processo de estruturação da celulose para o processo de produção de biocombustíveis, tanto através do uso de celulases como através de outras tecnologias que dispensem a utilização destas enzimas. Para desenvolver uma técnica de separação destas fibras, metodologias de simulação computacional são de grande importância. A modelagem molecular nos remete aos princípios gerais das dinâmicas clássicas e quânticas e aos princípios de extremos envolvendo grandezas físicas. Podemos utilizar ferramentas amplamente empregadas na física como método de estudo para o comportamento de sistemas biológicos, principalmente no campo da simulação de sistemas dinâmicos.



Figura 1: Corte da estrutura da celulose envolvida por moléculas de água após 60 ns de simulação, mostrando as ligações de hidrogênio intercadeias.

A simulação computacional vem desenvolvendo-se muito nos últimos anos, principalmente com o avanço dos computadores. Isto está ajudando no desenvolvimento de diversas áreas, como a bioquímica e a engenharia de materiais. Métodos envolvendo aproximações clássicas para sistemas quânticos expandiram-se muito rapidamente na última década. Porém com o avanço dos computadores e também dos métodos de computação paralela podemos cada vez mais simular sistemas maiores de maneira quântica e não clássica, podendo compreender com mais detalhadamente o processo de formação destas fibras.

ANEXO 7.12 – O CLUSTER JAGUATIRICA:

Os recursos computacionais necessários para uma abordagem como a apresentada neste trabalho são muitos. Boa parte de nossos resultados foram obtidos utilizando recursos do Center for Molecular Modeling da University of Pennsylvania, local da realização do estágio de doutorado no exterior. Ao mesmo tempo, começamos a montar em nosso laboratório na UFRJ um supercomputador que pudesse nos auxiliar para estes cálculos e trabalhos futuros, o cluster Jaguatirica.



Figura 1: Foto do cluster Jaguatirica.

Atualmente este computador conta com 312 núcleos de processamento dedicados para cálculos, além de outros 16 núcleos CPU e aproximadamente 1400 núcleos GPU utilizados para testes e também na administração dos recursos. Uma rede de alta velocidade (Infiniband DDR 4X) foi instalada em uma parte dos núcleos de

processamento, para que pudéssemos trabalhar com grandes sistemas, como os canais apresentados neste trabalho.

O sistema operacional do nosso cluster é o Linux Ubuntu 9.10 64bits Server e as filas para os trabalhos são gerenciadas pelos softwares PBS-Torque e Maui. Diversos softwares para cálculos de modelagem molecular estão instalados neste sistema e cerca de 20 pessoas utilizam diretamente os recursos desta máquina atualmente. ANEXO 7.13 – ARQUIVO DE PARÂMETROS (GROMACS E NAMD):

Exemplos de arquivos de parâmetros para cálculos de Dinâmica Molecular utilzando o software GROMACS e NAMD:

Na realização de cálculos de dinâmica molecular uma das etapas de maior importância é a escolha dos parâmetros a serem incluídos no arquivo de configuração do sistema a ser simulado. Neste arquivo incluímos infomações sobre os métodos utilizado para detalhe da simulação, como por exemplo o método de tratamento eletrostático ou os parâmetros que determinarão o ensemble que estamos simulando. A seguir temos dois exemplos destes arquivos, um para o GROMACS e outro para NAMD, utilizandos em nosso trabalho.

GROMACS (Arquivo de parâmetros .mdp):

; VARIOUS PREPROCESSING (OPTIONS:	
; Preprocessor information	on: use cpp syntax.	
include	=	
define	=	
; RUN CONTROL PARAMETERS		
integrator	= md	
; Start time and timestep in ps		
tinit	= 0	
dt	= 0.002	
nsteps	= 500000	
; For exact run continuation or redoing part of a run		
; Part index is updated a	automatically on checkpointing (keeps files separate)	
simulation_part	= 1	

= 0 init_step ; mode for center of mass motion removal comm-mode = Linear ; number of steps for center of mass motion removal nstcomm = 1 ; group(s) for center of mass motion removal comm-grps = System ; Max number of iterations in relax_shells niter = 20 ; Step size (ps^2) for minimization of flexible constraints fcstep = 0 ; Frequency of steepest descents steps when doing CG = 1000nstcgsteep nbfgscorr = 10 ; TEST PARTICLE INSERTION OPTIONS = 0.05 rtpi ; OUTPUT CONTROL OPTIONS ; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f) nstxout = 5000 nstvout = 5000 = 5000 nstfout ; Output frequency for energies to log file and energy file nstlog = 1000nstenergy = 1000; Output frequency and precision for xtc file nstxtcout = 1000= 1000xtc-precision ; This selects the subset of atoms for the xtc file. You can ; select multiple groups. By default all atoms will be written. xtc-grps ; Selection of energy groups energygrps = POPC Protein SOL NA+ CL-; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS ; nblist update frequency nstlist = 5 ; ns algorithm (simple or grid) ns_type = grid ; Periodic boundary conditions: xyz, no, xy

pbc = xyz periodic_molecules = no ; nblist cut-off rlist = 1.3; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW ; Method for doing electrostatics coulombtype = PME = 0 rcoulomb-switch rcoulomb = 1.3 ; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field epsilon-r = 1 epsilon_rf = 1 ; Method for doing Van der Waals vdw-type = Switch ; cut-off lengths rvdw-switch = 1.1 rvdw = 1.3 ; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure DispCorr = EnerPres ; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off table-extension = 1 ; Seperate tables between energy group pairs energygrp_table = ; Spacing for the PME/PPPM FFT grid fourierspacing = 0.12 ; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used fourier_nx = 0 fourier_ny = 0 fourier_nz = 0 ; EWALD/PME/PPPM parameters pme_order = 4 ewald rtol = 1e-05 ewald_geometry = 3d epsilon_surface = 0 optimize_fft = yes ; IMPLICIT SOLVENT ALGORITHM implicit_solvent = No

```
; GENERALIZED BORN ELECTROSTATICS
; Algorithm for calculating Born radii
gb algorithm
                         = Still
; Frequency of calculating the Born radii inside rlist
nstgbradii
                         = 1
; Cutoff for Born radii calculation; the contribution from atoms
; between rlist and rgbradii is updated every nstlist steps
rgbradii
                         = 2
; Dielectric coefficient of the implicit solvent
gb epsilon solvent
                         = 80
; Salt concentration in M for Generalized Born models
                         = 0
gb_saltconc
; Scaling factors used in the OBC GB model. Default values are OBC(II)
gb obc alpha
                         = 1
gb_obc_beta
                         = 0.8
                         = 4.85
gb_obc_gamma
; Surface tension (kJ/mol/nm<sup>2</sup>) for the SA (nonpolar surface) part of GBSA
; The default value (2.092) corresponds to 0.005 kcal/mol/Angstrom^2.
sa_surface_tension
                         = 2.092
; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl
                         = nose-hoover
; Groups to couple separately
                         = POP
                                  SOLV
tc-grps
                                           Protein
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t
                         = 0.1
                                  0.1
                                          0.1
                         = 308
                                  308
                                          308
ref-t
; Pressure coupling
pcoupl
                         = parrinello-rahman
                         = isotropic
pcoupltype
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
                         = 1
tau-p
                         = 4.5e-5
compressibility
                         = 1
ref-p
; Scaling of reference coordinates, No, All or COM
refcoord_scaling
                         = NO
; Random seed for Andersen thermostat
andersen_seed
                         = 815131
```

```
; OPTIONS FOR QMMM calculations
QMMM
                         = no
; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing
                         = no
; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen vel
                         = yes
gen_temp
                         = 308.0
                         = 173529
gen seed
; OPTIONS FOR BONDS
                         = all-bonds
constraints
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm
                         = lincs
; Do not constrain the start configuration
continuation
                         = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake iterations
Shake-SOR
                         = no
; Relative tolerance of shake
                         = 1e - 04
shake-tol
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order
                         = 4
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter
                         = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle
                         = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse
                         = no
; WALLS
; Number of walls, type, atom types, densities and box-z scale factor for
Ewald
                         = 0
nwall
; COM PULLING
; Pull type: no, umbrella, constraint or constant_force
pull
                         = no
```

```
; NMR refinement stuff
; Distance restraints type: No, Simple or Ensemble
disre
                         = No
; Force weighting of pairs in one distance restraint: Conservative or Equal
disre-weighting
                         = Conservative
; Use sqrt of the time averaged times the instantaneous violation
disre-mixed
                         = no
                         = 1000
disre-fc
disre-tau
                         = 0
; Output frequency for pair distances to energy file
nstdisreout
                         = 100
; Orientation restraints: No or Yes
orire
                         = no
; Orientation restraints force constant and tau for time averaging
orire-fc
                         = 0
                         = 0
orire-tau
orire-fitgrp
                         =
; Output frequency for trace(SD) and S to energy file
nstorireout
                         = 100
; Dihedral angle restraints: No or Yes
dihre
                         = no
dihre-fc
                         = 1000
; Free energy control stuff
free-energy
                        = no
```

NAMD (Arquivo de parâmetros .conf):

#initial config	
coordinates	2pk.2.4.0.pdb
bincoordinates	2pk.2.4.0r.coor
extendedsystem	2pk.2.4.0r.xsc
binvelocities	2pk.2.4.0r.vel
#temperature	300
seed	12345
# harmonic constraints	
constraints	off

consexp	2
consref	2pk.2.4.0.hrm
conskfile	2pk.2.4.0.hrm
conskcol	В
constraintScaling	L.O
# steered molecular dynamics	
SMD	off
SMDFile	2pk.2.4.0.std
SMDk	7.0
SMDVel	0.00001
SMDDir	0.0 0.0 -1.0
SMDOutputFreq	160
#output params	
binaryoutput	no
outputname	2pk.2.4.1
outputenergies	2000
outputtiming	2000
outputpressure	2000
binaryrestart	yes
dcdfile	2pk.2.4.1.dcd
dcdfreq	2000
XSTFreq	2000
restartname	2pk.2.4.1r
restartfreq	2000
#pme parameters	
#ldbUnloadPME	yes
PME	on
PMETolerance	10e-6
PMEInterpOrder	4
PMEGridspacing	1
PMEPencils	12
#temperature control and equilibrium	ration
langevin	on
langevintemp	300
langevindamping	0.1
#reassignfreq	100
#reassigntemp	300
#reassignincr	0

Rafael C. Bernardi

#reassignhold	300
#pressure control	
Usegrouppressure	yes
useflexiblecell	yes
useConstantArea	no
langevinpiston	on
langevinpistontarget	1
langevinpistonperiod	200
langevinpistondecay	100
langevinpistontemp	300
surfacetensiontarget	10.0
strainrate	0. 0. 0.
#brnch_root_list_opt	
splitpatch	hydrogen
hgroupcutoff	2.8
#integrator params	
timestep	2.0
firstTimestep	0
fullElectFrequency	2
nonbondedfreq	1
#force field params	
structure	2pk.2.4.0.psf
paratypecharmm	on
parameters /scratcha/treptow/2pk,	/namd/par_all27_prot_lipid.prm
parameters /scratcha/treptow/2pk,	/namd/par_UA-lipids-1.6.prm
exclude	scaled1-4
1-4scaling	1.0
rigidbonds	all
rigidtolerance	0.00001
rigiditerations	400
cutoff	11.0
pairlistdist	13.0
stepspercycle	16
switching	on
switchdist	8.0
#script	
#minimize	400
run	500000

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo